

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Ivana Klepáčová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**DETEKCE BIOMARKERŮ POMOCÍ
ELEKTROCHEMICKÝCH METOD MIKROFLUIDICKÝM
ČIPEM**

BIOMARKER DETECTION USING ELECTROCHEMICAL METHOD WITH MICROFLUIDIC CHIP

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ivana Klepáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Pavel Neužil, Dr., DSc.

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Ivana Klepáčová

ID: 146192

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Detekce biomarkerů pomocí elektrochemických metod mikrofluidickým čipem

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši použití markerů pro diagnostiku rakoviny a to s ohledem na včasnou detekci rakoviny. 2) Navrhněte optimální metodiku detekce markerů pomocí elektrochemických pulsních metod vhodných pro detekci několika marker ve stejném vzorku. Dále navrhněte vytvoření specifické vazby mezi biomarkerem a zlatým susbtrátem pomocí vhodných "cross-linkerů". 3) Vyberte jeden z významných markerů a navrhněte metodiku umožňující jeho měření v mikrofluidickém systému. Dále navrhněte metodiku hodnocení naměřených dat. 4) Sestavte navržený mikrofluidický systém vhodný pro multiplexní detekci minimálně 4 nebo více biomarkerů najednou a experimentálně zjistěte jeho LOD (limit of detection). 5) Zpracujte vzorky obsahující rozdílné koncentrace různých biomarkerů a zjistěte jejich vzájemnou interference. 6) Proveďte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení, případně navrhněte optimalizaci systému.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BARD A.J. a L.R. FAULKNER. Electrochemical methods: fundamentals and applications. 2nd ed. Wiley 2001, ISBN-13: 978-0471043720.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. Pavel Neužil, Dr., DSc.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Práca je zameraná na vývoj elektrochemického systému s mikrofluidickou platformou pre detekciu niekoľkých biomarkerov. Analyzuje problematiku použitia biomarkerov pre včasnú diagnostiku rakoviny. Teoretická časť obsahuje základné informácie o voltametrických metódach a o mikrofluidických systémoch. Praktická časť poskytuje riešenia mikrofluidických čipov, vrátane popisu použitých materiálov, dizajnov, metódik prípravy a závery z testovania vyrobených mikrofluidických systémov. V práci je popísaný elektrochemický „lock-in“ systém merajúci odozvu zo 4 elektrochemických buniek súčasne. K meraniam so systémom bol použitý elektrochemický čip pozostávajúci zo 64 elektrochemických buniek. Výsledky analýzy obsahujú spracovanie testov systému a detekovaných voltametrických kriviek roztoku $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ a cysteínu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Nádorový biomarker, microfluidika, PDMS, PMMA, cyklická voltametria, diferenčná pulzná voltametria, „lock-in“ zosilovač

ABSTRACT

The thesis is focused on the development of the electrochemical system with microfluidic platform for the detection of multiple biomarkers. It analyses the use of biomarkers for the early diagnosis of cancer. The theoretical part contains basic information about voltammetric methods and microfluidic systems. The practical part provides solutions to the microfluidic chips, including the description of the used materials, designs, methodologies of preparation and conclusions from the testing of the manufactured microfluidic systems. The thesis describes the lock-in electrochemical system which measures the response of 4 electrochemical cells simultaneously. For the electrochemical system measurements, an electrochemical chip consisting of 64 electrochemical cells was used. The results of the analysis include the processing of the system tests and detected voltammetric curves of the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ solution and cysteine.

KEYWORDS

Cancer biomarker, microfluidics, PDMS, PMMA, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, lock-in amplifier

KLEPÁČOVÁ, I. *Detekce biomarkerů pomocí elektrochemických metod mikrofluidickým čipem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Pavel Neužil, Dr., DSc.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu na tému „*Detekce biomarkerů pomocí elektrochemických metod mikrofluidickým čipem*“ som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto diplomovej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovení § 11 a nasledujúce zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákoníka č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce Ing. Pavlovi Neužilovi, Dr., DSc. za množstvo času, ktoré mi venoval počas riešenia odborných i praktických otázok spojených s diplomovou prácou, za jeho odborné vedenie, pripomienky a návrhy. Veľmi si cením príležitosť venovať sa výskumu s jeho skupinami na Ústave mikroelektroniky Vysokého učení technického v Brně a na Department of Microsystem Engineering na Northwestern Polytechnical University v Xi'ane. Členom oboch skupín chcem poďakovať za ochotu pomôcť, cenné rady a pomoc pri práci v laboratóriu. Osobitne ďakujem Ing. Radimovi Hrdému, Ph.D., Ing. Vojtěchovi Svatošovi a Ing. Hane Kynclovej z Ústavu mikroeletektrotechniky, Bc. Martinovi Holubovi z Fakulty strojního inženýrství na Vysokom učení technickom v Brně a Mgr. Martinovi Bartošíkovi, Ph.D. z Masarykovho Onkologického ústavu a centru SIX.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

OBSAH

Úvod	1
1 Použitie biomarkerov pre diagnostiku rakoviny	2
1.1 Význam a využitie rakovinových markerov	2
1.2 Charakteristika rakovinových markerov pre použitie v lekárskej praxi ...	3
1.3 Klasifikácia rakovinových markerov	3
1.4 Meranie hladiny rakovinových markerov	4
1.5 Metódy detekcie rakovinových biomarkerov	5
1.6 Biomarker PSA	6
2 Elektrochemické metódy – polarografia a voltametria	8
2.1 Inštrumentácia voltametrie	9
2.2 Pracovné elektródy	10
2.2.1 Ortuťové elektródy.....	10
2.2.2 Elektródy z tuhých materiálov	11
2.2.3 Mikroelektródy	12
2.3 Analyzovaný roztok	14
2.4 Voltametrická krivka	14
2.5 Cyklická voltametria	17
2.6 Pulzné metódy voltametrie	18
2.6.1 Normálna pulzná voltametria.....	19
2.6.2 Diferenčná pulzná voltametria	19
2.7 Výhody a nevýhody voltametrie	20
3 Teória mikrofluidických systémov	22
3.1 Prúdenie kvapaliny v mikrokanáloch	22

3.1.1	Reynoldsovo číslo	23
3.1.2	Hagen-Poiseuillova rovnica	23
3.1.3	Kontrola toku v mikrokanáloch	24
3.2	Materiály na výrobu mikrofluidických systémov	24
3.2.1	Kremík a sklo	24
3.2.2	Polymérne materiály	25
3.3	Techniky výroby mikrofluidických systémov	26
3.4	Výhody mikrofluidických systémov	26
4	Metodika detekcie biomarkerov	28
5	PDMS Mikrofluidický systém	30
5.1	Charakteristika PDMS	30
5.2	Dizajn mikrofluidických kanálov	31
5.3	Výroba kremíkovej matrice pre PDMS	32
5.3.1	Príprava substrátu	32
5.3.2	„Soft“ litografia	32
5.3.3	Leptanie oxidu kremíka	34
5.3.4	Leptanie kremíka	34
5.3.5	Kontrola vyrobenej matrice	35
5.4	Výroba II. generácie kremíkovej matrice pre PDMS	37
5.5	Výroba PDMS mikrofluidického čipu	38
5.5.1	Príprava PDMS	38
5.5.2	Oddelenie PDMS od kremíkovej matrice	39
5.5.3	Oddelenie PDMS od kremíkovej matrice po aplikovaní FAS 17	39
5.5.4	Uzavretie štruktúr PDMS	40
5.6	Testovanie PDMS mikrofluidického systému	40
5.7	Diskusia	44
6	PMMA mikrofluidický systém	45

6.1	Charakteristika PMMA	45
6.2	Dizajn a výroba PMMA mikrofluidického čipu	45
6.2.1	Kontrola parametrov vyrobeného čipu	47
6.2.2	Uzavretie štruktúr PMMA	50
6.3	Testovanie PMMA mikrofluidického systému	51
6.4	Diskusia	53
6.5	Nový dizajn a výroba mikrofluidických systémov	55
6.6	Testovanie PMMA mikrofluidických systémov	57
6.7	Diskusia	59
7	Elektrochemické merania	60
7.1	Charakteristika „lock-in“ elektrochemického systému.....	60
7.2	Princíp fungovania „lock-in“ systému	61
7.3	Výroba elektrochemických čipov	62
7.4	Testovanie elektrochemického čipu metódou CV	63
7.5	Testovanie elektrochemického systému	65
7.6	Testovanie elektrochemického čipu metódou CLV.....	65
7.7	II. generácia „lock-in“ elektrochemického systému	67
7.8	Detekcia cysteínu	68
7.9	Diskusia	71
	Záver	72
	Literatúra	74

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 2-1 Schéma zapojenia obvodu pre voltametrické meranie: A) dvojelektrodové, B) trojelektrodové usporiadanie (r referentná, w pracovná, a pomocná elektróda) [28].	9
Obr. 2-2 Polarografická vlna: A) oscilácie prúdu spôsobené odkvapkávaním ortuti, limitný prúd meraný v strede oscilácií, B) naznačenie metódy tast-polarografie [28].	11
Obr. 2-3 Bežne používané tvary a súbory mikroelektrod [23].	14
Obr. 2-4: Zjednodušená voltametrická krivka v základnom elektrolyte [28].	15
Obr. 2-5 Princíp voltametrickej analýzy: A) časový priebeh potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu; B) polarizačná krivka registrovaná v roztoku bez analytu (čiarkovaná krivka) a v roztoku s obsahom analytov A a C (plná krivka). [28]	16
Obr. 2-6 Priebeh potenciálu cyklickej voltametrie [35].	17
Obr. 2-7 Modelový voltamogram cyklickej voltametrie. Upravené z: [33]	18
Obr. 2-8 Charakter vkladaneho potenciálu na elektródu pri normálnej pulznej voltametrii a registrovaná voltametrická krivka [23].	19
Obr. 2-9 Charakter vkladaneho potenciálu na elektródu pri diferenčnej pulznej voltametrii a registrovaná voltametrická krivka [23].	20
Obr. 2-10 Zobrazenie vplyvu amplitúdy pulzu napätia na diferenčný pulzný voltamogram olova a kadmia, hodnoty amplitúdy pulzu napätia 1) -10 mV, 2) -25 mV, 3) -75 mV [37].	20
Obr. 3-1 Mikrofluidický systém naplnený rôznymi farbami pre zobrazenie toku kvapaliny prúdiacej zhora nadol. [44]	23
Obr. 4-1 Návrh mikrokanálov na elektrochemickom čipe v programe L-Edit.	28
Obr. 4-2 Imunosenzor na zlatej elektróde [18].	29
Obr. 5-1 Model zobrazujúci A) PDMS mikrofluidický čip a B) kremíkovú matricu ako negatív ku výsledným mikrofluidickým kanálom	32
Obr. 5-2 Dizajn mikrofluidických kanálov v programe L-Edit pre výrobu kremíkovej matrice.	33

Obr. 5-3 Ilustrácia profilov leptaných A) izotropicky (napr. v zmesi HF, HNO ₃ a CH ₃ COOH) a B) anizotropicky (napr. v KOH, NaOH, CeOH, RbOH) [68].....	34
Obr. 5-4 Matrica mikrofluidického čipu pre výrobu PDMS čipu s vyleptanou vrstvou kremíka cca 20 μm (svetlo-šedá farba)	35
Obr. 5-5 Profil matrice zobrazujúci povrch štruktúr pre výrobu dvoch mikrofluidických kanálov (vyššie štruktúry) a tzv. ostrovčeka (unížená časť).....	36
Obr. 5-6 Detail profilu matrice zobrazujúci prechod povrchu štruktúr pre výrobu tzv. ostrovčeka (unížená časť) a mikrofluidického kanála (vyvýšená štruktúra).....	36
Obr. 5-7 Profil leptaného povrchu kremíkového waferu	37
Obr. 5-8 Detail profilu leptaného povrchu kremíkového waferu	37
Obr. 5-9 Dizajn mikrofluidických kanálov v programe L-Edit pre výrobu II. generácie kremíkovej matice.....	38
Obr. 5-10 Mikrofluidický systém a samostatný PDMS mikrofluidický čip.....	41
Obr. 5-11 „Syringe“ pumpa typu NE-1000 (New Era Pump System, Inc.) použitá k testovaniu PDMS mikrofluidického systému	42
Obr. 5-12 Pretekánie fluoresceínu vybraným druhým vertikálnym kanálom zľava.....	43
Obr. 5-13 Pretekánie fluoresceínu vybraným krajným kanálom zľava	43
Obr. 6-1 Dizajn PMMA mikrofluidického čipu v 3D dizajnovom software SolidWorks	45
Obr. 6-2 CNC obrábací nástroj pre výrobu PMMA mikrofluidického čipu (JDHGT400 A10H, Jingdiao).....	46
Obr. 6-3 Povrch mikrofluidického čipu č. 1, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček	47
Obr. 6-4 Povrch mikrofluidického čipu č. 2, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček	48
Obr. 6-5 Povrch mikrofluidického čipu č. 3, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček	48
Obr. 6-6 Povrch mikrofluidického čipu č. 4, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček	49
Obr. 6-7 Tabuľka nameraných hodnôt výšky mikrofluidického kanála v smere osí <i>x</i> a <i>y</i>	

s príslušnými hodnotami RMS, pre každý čip na dvoch miestach	49
Obr. 6-8 Mikrofluidický systém s PMMA čipom.....	51
Obr. 6-9 PMMA čip s držiakom ihlíc napojený na ihly a samostatný PMMA čip	52
Obr. 6-10 Pretekávanie metylénovej modrej vybraným druhým vertikálnym kanálom zľava.....	53
Obr. 6-11 Pretekávanie metylénovej modrej vybranými kanálmi jedna a tri zľava.....	53
Obr. 6-12 Ukážka zdrojového kódu pre vytvorenie jednosmerovo orientovaných mikrofluidických kanálov pomocou voľne dostupného editoru zdrojových kódov Notepad++ a Nanolithography Toolbox v jazyku CNST scripting	55
Obr. 6-13 Vľavo: PMMA diel s 0.5mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe jednosmerovo orientovaných kanálov	56
Obr. 6-14 Vľavo: PMMA diel s 0.4mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe veľkých „komôrok“	56
Obr. 6-15 Vľavo: PMMA diel s 0.4mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe malých „komôrok“	56
Obr. 6-16 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi s roztokom metylénovej modrej pretekajúcej celým vybraným kanálom	57
Obr. 6-17 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi s roztokom metylénovej modrej pretekajúcej dvoma vybranými kanálmi.....	58
Obr. 6-18 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi naplnenými roztokmi metylénovej modrej a fluoresceínu pretekáúcimi celým povrchom kanálov. Systém bol osvetlený UV svetlom s vlnovou dĺžkou 395 nm pri výkone 40 W.....	58
Obr. 6-19 Vľavo: čip s ukážkou časti mikrofluidického systému „komôrok“ ktorými preteká metylénová modrá, vľavo ukážka naplnenia všetkých „komôrok“	59
Obr. 7-1 Prenosný „lock-in“ elektrochemický systém	60
Obr. 7-2 Elektrochemický čip tvorený 64 elektrochemickými bunkami rozdelenými do 16 klastrov po 4 elektrochemické bunky	61
Obr. 7-3 Excitačné symetrické napätie v tvare píly s napätím v rozmedzí ± 500 mV (vľavo) so superponovanými štvorcovými vlnami s amplitúdou ≈ 200 mV (vpravo).....	61

Obr. 7-4 Zjednodušený model procesu prípravy elektrochemických čipov	62
Obr. 7-5 A) Fotografia klastra so 4 elektrochemickými bunkami so spojenými pracovnými a separovanými pseudoreferenčnými elektródami. B) Detail elektrochemickej bunky s povrchom pracovnej elektródy $\approx 27\times$ väčším ako pseudoreferenčnej elektródy	63
Obr. 7-6 Krivky z cyklickej voltametre testované v $\approx 2,5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku pri rýchlostiach skenovania $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ až $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ [materiál z publikácie]..	64
Obr. 7-7 Odčítané hodnoty I_{WEO} linerárne proporcionálne ν [materiál z publikácie] ...	64
Obr. 7-8 Krivky z CLV testované v $\approx 2,5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku pri rýchlostiach skenovania $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ až $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	66
Obr. 7-9 Krivky z CLV testované v $\approx 2,5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku: vľavo CLV 15 klasterov, vpravo CLV klasteru č. 6 pri rýchlostiach skenovania nastavených na $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	66
Obr. 7-10 Detail čipu s nedoleptanou vrstvou SiO_2	67
Obr. 7-11 II. generácia „lock-in“ elektrochemického systému	68
Obr. 7-12 CV krivky pufru Britton-Robinson	69
Obr. 7-13 CV krivky $\approx 0,04 \text{ M}$ cysteínu v pufru Britton-Robinson v pomere 1:10, šípka označuje najlepšie viditeľný oxidačný pík.....	69
Obr. 7-14 DPV krivky pufru Britton-Robinson.....	70
Obr. 7-15 DPV krivky $\approx 0,04 \text{ M}$ cysteínu v pufru Britton-Robinson v pomere 1:10, šípka označuje najlepšie viditeľný oxidačný pík.....	70

ÚVOD

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) patrí rakovina v celosvetovom meradle k hlavným príčinám morbidít a mortality populácie. V roku 2012 sa objavilo 14 miliónov nových prípadov rakoviny a 8,2 miliónov úmrtí súvisiacich s rakovinou. Očakáva sa, že v nasledujúcich dvoch desaťročiach stúpne počet nových prípadov o zhruba 70 %. Mnohé rakoviny majú vysokú šancu vyliečenia, pokiaľ sú skoro diagnostikované a je zavedená adekvátne liečba. [1]

Biomarkery predstavujú chemické substancie produkované malignými bunkami alebo organizmom ako odpoveď na nádorové bujnenie. V telových tekutinách kolujú vo zvýšenej koncentrácii často pred tým, než sa objavia akékoľvek iné príznaky rakoviny. Ich detekcia je dôležitá, pretože včasná diagnostika ochorenia zvyšuje šancu vyliečenia pacienta a z pohľadu financií znižuje náklady spojené s liečbou ochorenia v pokročilom štádiu. [2]

V klinickej praxi sa biomarkery stanovujú pomocou komerčných analytických setov, väčšinou založených na imunoenzymatickej reakcii. [3] V diplomovej práci je analyzovaná problematika jednotlivých krokov, ktoré vedú k vytvoreniu systému na detekovanie biomarkerov elektrochemickými metódami s pridaním mikrofluidickej platformy.

Metodika detekcie založená na použití elektrických veličín podporuje rozvoj miniaturizovaných prenosných systémov, pretože umožňuje jednoduché integrovanie systémov do výroby. Použitie väčšieho počtu planárnych elektród na jednom čipe, navyše v kombinácii s mikrofluidickými kanálmi, má výhody zrýchlenia a zefektívnenia reakcie (skrátaná difúzna vzdialenosť, rýchle zahrievanie vzorky), či redukciu spotreby reagentov. Navyše, pri schopnosti detekovať súbežne signál z viacerých elektród, je možné štatisticky porovnať paralelne prebiehajúce experimenty. Tieto vlastnosti môžu v prípade masovej produkcie vplyvať na zníženie ceny testu, prostredníctvom čoho sa test dostane k širšej populácii. Pre včasnú detekciu ochorenia je toto riešenie ideálne. [4; 5; 6]

1 POUŽITIE BIOMARKEROV PRE DIAGNOSTIKU RAKOVINY

Rakovina je všeobecne používaný názov pre rozsiahlu skupinu chorôb, ktoré môžu postihnúť ktorúkoľvek časť tela. Jej definujúcim znakom je tvorba abnormálnych buniek, ktoré nekontrolovateľne rýchlo rastú a rozširujú sa mimo svojich bežných hraníc. Rakovinové bunky potom napádajú susediace tkanivá a môžu metastázovať do vzdialených miest. Dané rozšírenie, t.j. metastázovanie, je hlavnou príčinou smrti pri rakovine. [1]

V mnohých prípadoch je možné znížiť riziko vzniku nádorového ochorenia. Primárna prevencia predstavuje vyhýbanie sa vystaveniu rizikových faktorov. Za najpodstatnejší rizikový faktor rakoviny je považovaný práve životný štýl jedinca. Podstatou sekundárnej prevencie je potom včasná detekcia samotného vzniknutého nádorového ochorenia, ktorá je predpokladom úspešnejšej liečby pacienta. Najvýznamnejšia časť rakovín môže byť potom vyliečená operáciou doplnenou o rádioterapiu alebo chemoterapiu. [1; 7; 8]

Pojem biomarker predstavuje charakteristiku, ktorá je objektívne merateľná a vyčísliteľná ako indikátor normálnych biologických procesov, patogénnych procesov alebo farmakologických odoziev na liečbu. Je aplikovateľný pri detekcii choroby i monitorovaní zdravotného stavu. [9]

Nádorové markery, onkomarkery, sú chemické substancie prítomné v nádore, alebo produkované nádorom ako odpoveď na prítomnosť nádoru. Hladiny cirkulujúcich nádorových markerov je možné merať v periférnej krvi a iných telových tekutinách. Ich koncentrácia závisí na veľkosti nádoru, intenzite sekrécie daného nádorového markeru a metabolickej degradácii molekúl. V prípade vyliečenia látka z tela vymizne, alebo jej hladiny klesnú k norme. [3]

1.1 Význam a využitie rakovinových markerov

V súčasnej dobe patrí problematika rakovinových biomarkerov k hlavnému zameraniu práce vedcov v oblasti rakoviny. [10]

Použitie biomarkerov sprevádza lekárov v každom kroku liečby rakoviny. Nádorové markery majú uplatnenie pri rozoznaní osôb s rizikom rakoviny, prispievajú k včasnej detekcii v počiatočnom stave ochorenia, určeniu diagnózy, prognóze vývinu

ochorenia i predpokladu a sledovaniu relapsu. Vhodne zvolený marker tiež môže pomôcť pri odhade reakcie tumoru na liečbu, čo následne umožňuje lekárom zaujať stanovisko k terapii. Takýto prístup vedie k spojeniu správnej liečby pre správneho pacienta, oproti stále pretrvávajúcej teórii jednej liečby pre všetkých. [11; 12; 13]

Na prevenciu, screening a individuálne stratégie liečby pacientov má vplyv i rozvoj objemných biologických databáz, metód k charakterizovaniu pacientov ako proteomika, genomika, vývoj rôznych bunkových analýzátorov, či rozvoj telemedicíny a nástrojov na analýzu veľkého objemu dát. [14]

1.2 Charakteristika rakovinových markerov pre použitie v lekárskej praxi

Na nádorový marker sú kladené nasledujúce požiadavky:

- produkcia iba pri nádorovom ochorení,
- orgánová špecifickosť,
- výskyt vo vysokých koncentráciách v biologických tekutinách,
- korelácia s veľkosťou nádoru, štádiom ochorenia,
- korelácia s prognózou a účinnosťou terapie.

V súčasnej dobe neexistuje nádorový marker, ktorý by dané kritériá spĺňal. Hlavné využitie onkomarkerov je tak najmä v sledovaní už diagnostikovaného nádorového ochorenia, predovšetkým pri monitorovaní liečby a včasnom záchyťe progresie a recidívy. [15; 16]

Výnimkou je využitie markera prostatický špecifický antigén (PSA), ktorého stanovenie je súčasťou screeningu karcinómu prostaty. [3]

1.3 Klasifikácia rakovinových markerov

Biomarkery môžu byť klasifikované podľa rôznych hľadísk. Podľa vzťahu k ochoreniu je možné rozoznať markery:

- predisponujúce (rizikový faktor),
- screeningové,
- včasnej, primárnej a diferenciálnej diagnostiky,
- na monitorovanie priebehu ochorenia a jeho komplikácií,
- pre voľbu a monitorovanie liečby,

- pre odhad intervalu bez choroby, tzv. „DFI“. [15]

Podľa povahy rozoznávame biomarkery proteínové, proteomické, DNA, RNA, transkriptomické, mikroRNA, metabolomické, glykomické. [15]

Vzhľadom k biologickému charakteru a pôvodu rozlišujeme markery cirkulujúce v tele pacienta na:

- monoklonálne imunoglobulíny a ich fragmenty,
- glykoproteíny a ich fragmenty (CA 15-3, CA 19-9, CA 125, CA 72-4),
- karcinofetálne antigény (α -fetoprotein (AFP), karcinoembryonálny antigén (CEA)),
- hormóny (humánny choriogonadotropín (hCG), parathormón (PTH), kalcitonín),
- enzýmy (prostatická kyslá fosfatáza, prostatický špecifický antigén, neurón – špecifická enoláza),
- ďalšie látky (β_2 -mikroglobulín, SCCA, thyreoglobulín). [3]

1.4 Meranie hladiny rakovinových markerov

Meranie hladiny nádorového markeru prebieha pomocou technológie určenej k in vitro diagnostike. Metodika musí byť v súlade s Nariadením vlády č. 453/2004 Sb. zo dňa 7. júla 2004 v platnom znení, ktorým sú stanovené technické požiadavky na diagnostické zdravotné prostriedky in vitro. Je pravidelne sledovaná vnútornou kontrolou kvality. [17]

Nádorové markery sa stanovujú komerčnými analytickými setmi. Potreba dlhodobého sledovania pacienta vyžaduje nemeniace sa technológie stanovenia pre daný marker. Testy jednotlivých výrobcov nemusia vždy dávať rovnaké výsledky. V klinickej praxi je tak dôležité u jedného pacienta používať stále rovnaké analytické testy. Pokiaľ by bolo nevyhnutné realizovať zmenu technológie, je potrebné najprv vykonať porovnávaciu sériu meraní na dostatočnom množstve konkrétnych vzoriek pacienta pomocou oboch súprav a získať tak informácie o správaní novej súpravy v konkrétnych podmienkach. [3; 17]

Vyšetrenie bez podozrenia na konkrétny nádor nie je indikované pre nízku senzitivitu a špecificitu. Hlavnými problémami pri stanovení a hodnotení hladiny nádorových markerov sú:

- zvýšenie hladiny nádorového markeru môže byť vyvolané benignou príčinou,
- nádorové markery nie sú zvýšené u každého jedinca s daným typom nádoru,

- nádorové markery sú iba výnimočne detekovateľné v počiatočných štádiách nádoru,
- nádorová nešpecifickosť – konkrétny marker môže byť zvýšený pri rôznych druhoch malignity. [3]

Pre klinické hodnotenie markerov sa používa referenčná hladina „cut off“. V primárnej diagnostike predstavuje hladinu markeru, pod ktorou je 95 % zdravých ľudí, eventuálne pacientov s benigným ochorením. Pri sledovaní nádoru alebo monitorovaní liečby je definovaná ako hladina markeru, pod ktorou leží 95 % pacientov v kompletnej remisii. Väčšiu výpovednú hodnotu má krivka opakovaných hodnôt než jednotlivá izolovaná hodnota. [15]

Koncentrácia biomarkeru sa pohybuje v oblasti hodnôt mikrogramov až nanogramov na liter. Normálne a patologické hodnoty určitého biomarkeru sú preto definované pre jednotlivé metodické postupy a pri hodnotení výsledkov sa prihliada k normám vydávaným konkrétnym laboratóriom, v ktorom bol test uskutočnený. [3]

1.5 Metódy detekcie rakovinových biomarkerov

Proteínové biomarkery môžu byť detekované pomocou elektrochemických metód, ktoré sú výhodné z hľadiska nízkych nákladov, krátkeho času analýzy a vynikajúcej citlivosti. Reálne vzorky určené na analýzu pochádzajú zo séra pacientov i ďalších telových tekutín. Biomarkery sú v nich často prítomné vo veľmi nízkych koncentráciách. Z tohto dôvodu napreduje vývoj imunologických testov založených na imobilizácii povrchu pomocou protilátky pre naviazanie biomarkera. Ďalej nasleduje naviazanie označenej sekundárnej protilátky a monitorovanie signálu, ktorý je do značnej miery zosilnený prostredníctvom aktivity enzýmov alebo nanočastíc. [18]

V posledných rokoch dochádza k čoraz častejšiemu používaniu syntetických aptamérov s vysokou afinitou k rôznym proteínom. Aptaméry majú rovnakú funkciu ako imobilizovaná protilátka. Platforma s aptamérom je označovaná ako aptasenzor a je používaná namiesto imunosenzorov s protilátkami. [18]

V prípade, že proteínový biomarker predstavuje glykoproteín, je možné špecificky zachytiť jeho glykánové časti pomocou lektínov. Lektínové biosenzory sú konštruované na detekciu proteínových molekúl aj pre identifikáciu celých rakovinových buniek. [18]

1.6 Biomarker PSA

PSA je serínová proteínáza produkovaná prostatickým tkanivom. Zodpovedá za skvapalnenie seminálnej tekutiny, ktorá uľahčuje pohyb spermií. Vyskytuje sa viazaný na bielkoviny krvnej plazmy alebo voľne. Označenie voľnej frakcie je fPSA. Z dôvodu absolútnej špecificity k tkanivu predstavuje PSA hodnotný biomarker pre karcinóm prostaty. [3; 17]

Zvýšenie hodnoty môže byť spojené s akútnym alebo chronickým zápalom prostaty, predchádzajúcim digitálnym vyšetrením, biopsiou, iným mechanickým dráždením prostaty, či zvyšujúcim sa vekom, kedy hodnota PSA narastá spolu so zväčšovaním prostaty. Napriek tomu umožňuje sledovanie hodnoty PSA hodnotiť úspešnosť liečby, monitorovať progresiu nádoru i recidívu po liečbe. Uplatňuje sa tiež pri skríningu vybranej vzorky populácie, kedy môže odhaliť karcinóm prostaty i predpovedať agresivitu ochorenia. [19; 20]

Normálna hranica pre PSA s hodnotou $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bola prvýkrát navrhnutá v štúdií od Hybritech Inc, San Diego v roku 1986. Neskôr štúdie väčších a klinicky významnejších populácií s cieľom definovať optimálnu medznú hodnotu PSA s dostatočnou senzitivitou a špecificitou kolísali medzi hodnotami 2,8 až $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Skriningová štúdia s 6630 mužmi vo veku 50 až 74 rokov viedla Úrad pre kontrolu potravín a liečiv v USA (FDA) k prvému ustanoveniu horného limitu PSA na $3,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ vo vekovej skupine 50 až 54 rokov. Následne bola hodnota $\text{PSA} > 4,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ustanovená k odporúčaniu biopsie. [21]

Podľa Českej spoločnosti klinickej biochémie, Českej onkologickej spoločnosti a Českej spoločnosti nukleárnej medicíny zodpovedajú doporučované hodnoty cut off PSA pre mužov do 50 rokov hodnote $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, do 60 rokov $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, do 70 rokov $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a u mužov starších ako 70 rokov $6,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pre odlíšenie benignej hyperplazie prostaty, nenádorového zväčšenia prostaty vznikajúceho v procese starnutia, od karcinomu sa stanovuje pomer voľného a celkového PSA. Frakcia fPSA/PSA sa pre maligný nádor pohybuje v rozmedzí 0 – 15 %, hraničné sú hodnoty 15 – 20 % a u benigného ochorenia nad 20 %. Prvú základnú a referenčnú hodnotu PSA je doporučené získať vo veku 40 rokov. Ďalej by mal byť muž vyšetrovaný od 50 rokov každoročne, muž s rodinnou anamnézou karcinómu prostaty a černošská populácia od 40 rokov. Zvýšenie PSA o viac ako $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ročne v troch po sebe idúcich vyšetreniach znamená 90% pravdepodobnosť karcinómu prostaty. Hladina nad $30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ môže signalizovať vzdialenejšie metastázy. Pretrvávajúce zvýšené koncentrácie v sére po radikálnej prostatektómii znamenajú prítomnosť zbytkovej choroby alebo lokálny

návrat. Pri terapii pokles PSA zvyčajne koreluje s dĺžkou prežitia pacienta. Napriek možnosti použitia testu PSA je nevyhnutné vykonávať aj digitálne rektálne vyšetrenie. Asi 25 % mužov, ktorí trpia karcinómom prostaty, má totiž PSA v medziach normy. [3; 17]

Testy PSA prebiehajú na mnohých systémoch za použitia rôznych protilátok. Získané hodnoty PSA sa tak líšia vzhľadom ku konkrétnym laboratóriam. Z tohto dôvodu bola zavedená kalibrácia testov podľa štandardu WHO. [22]

2 ELEKTROCHEMICKÉ METÓDY – POLAROGRAFIA A VOLTAMETRIA

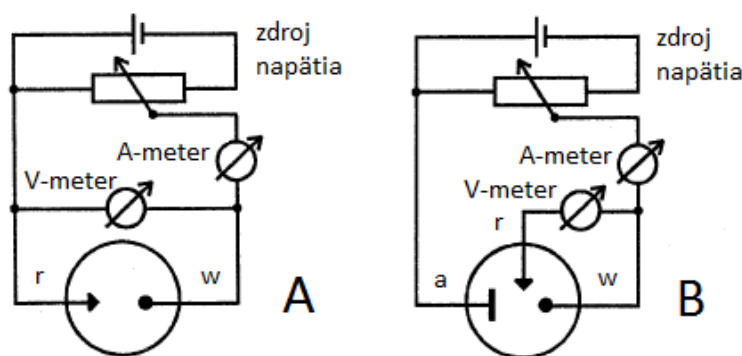
Elektrochemické metódy sú založené na vzťahoch medzi neelektrickými veličinami (látkové množstvo, koncentrácia, hmotnosť, objem, čas, povrchové napätie) a elektrickými veličinami (elektrický prúd, napätie, odpor, elektródový potenciál, impedancia, vodivosť atď.). Spájajú sa s procesmi, ktoré súvisia s elektrickými vlastnosťami roztoku alebo s elektrochemickými reakciami prebiehajúcimi na rozhraní elektróda – roztok v zostavenom elektrochemickom článku. Meraný analytický signál a excitačný, t.j. signál použitý v interakcii so vzorkou na generovanie analytického signálu, majú charakter veličín, ktoré je možné merať samostatne, v kombinácii alebo ako funkcie, napr. času, objemu roztoku činidla a pod. Existuje teda veľký počet elektrochemických techník, ktoré našli uplatnenie v mnohých smeroch, zahŕňajúc environmentálne monitorovanie, kontrolu kvality materiálov v priemysle alebo biomedicínske analýzy. [23; 24]

Princípom metód polarografie a voltametrie je sledovanie zmien prúdu, ktoré nastávajú z dôvodu prebiehajúcich redoxných dejov pri postupnom aplikovaní napätia vkladaného na elektródu. Z dôvodu rozlíšenia metód sa polarografiou označuje voltametria využívajúca ortuťovú kvapkajúcu elektródu ako pracovnú elektródu. S polarografiou je spojené meno profesora Jaroslava Heyrovského, ktorý v roku 1959 získal Nobelovu cenu v oblasti chémie za objav a rozvoj polarografických metód. [25; 26; 27]

Pri voltametrii je sledovaná závislosť elektrického prúdu, ktorý tečie pracovnou elektródou ponorenou v analyzovanom roztoku, na potenciáli, ktorý sa s časom mení. Ak sa v roztoku nenachádza látka, ktorá by sa oxidovala alebo redukovala, dochádza k polarizácii elektródy. Elektródou tak preteká iba nabíjací prúd, t.j. kapacitný prúd, potrebný na zmenu jej potenciálu. Pokiaľ sa v roztoku nachádza látka, tzv. depolarizátor, ktorá sa pri určitom potenciáli oxiduje alebo redukuje, dochádza k depolarizácii elektródy a pretekaniu elektrolytického, t.j. faradaického prúdu. Veľkosť tohto prúdu je mierou koncentrácie depolarizátora. V praxi predstavujú depolarizátory stanovované analyty. [23]

2.1 Inštrumentácia voltametrie

Princíp zapojenia obvodu k voltametrickému meraniu je znázornený na Obr. 2-1. Meranie môže prebiehať v dvojelektrodovom alebo trojelektrodovom usporiadaní. Napätie zo zdroja vkladané na pracovnú a referentnú elektródu je merané voltmetrom, vznikajúci prúd ampérmetrom. Potenciál nepolarizovateľnej referentnej elektródy je konštantný, preto sa so zmenou vloženého napätia mení iba potenciál pracovnej elektródy. [28]



Obr. 2-1 Schéma zapojenia obvodu pre voltametrické meranie: A) dvojelektrodové, B) trojelektrodové usporiadanie (r referentná, w pracovná, a pomocná elektróda) [28].

Dvojelektrodové usporiadanie pozostáva z elektródy referentnej a pracovnej. Nevýhodou takéhoto usporiadania je, že potenciál pracovnej elektródy nie je presne známy. Pri prechode prúdu sa časť vloženého napätia stráca na odpore analyzovaného roztoku. Úbytok napätia je rovný súčinu tohto odporu a prechádzajúceho prúdu. Trojelektrodové zapojenie obsahuje navyše pomocnú elektródu. Prúd tečie iba medzi pomocnou a pracovnou elektródou. Skutočný potenciál pracovnej elektródy sa meria medzi pracovnou a referentnou elektródou. Elektrochemické reakcie prebiehajúce pri prechode prúdu na pomocnej elektróde sa nesledujú, zvyčajne sú to oxidácia vody alebo redukcia vodíkového iónu. Zdrojom napätia v trojelektrodovom zapojení je elektronický potenciostat. Tento prístroj udržiava potenciál pracovnej elektródy na požadovanej hodnote. Požadovaný potenciál porovnáva s aktuálnym zmeraným potenciálom a prípadný rozdiel automaticky vyrovnáva zmenou napätia na pomocnej elektróde. [23; 28]

Referentné elektródy majú v porovnaní s pracovnými elektródami majú pomocné elektródy podstatne väčší povrch. Vyrábajú sa z inertného materiálu, aby sa zabránilo

kontaminácii roztoku produktmi elektrochemických reakcií, ktoré na nej pri prechode prúdu prebiehajú. Pracovné elektródy sú popísané samostatne v nasledujúcej podkapitole. [28]

2.2 Pracovné elektródy

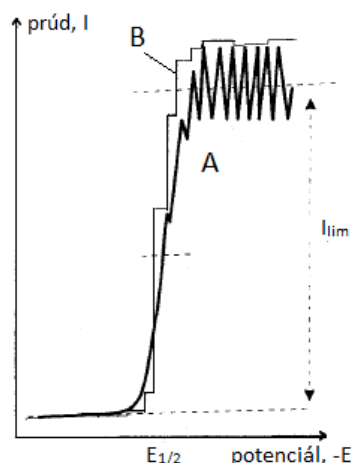
Podľa materiálu sa pracovné elektródy voltametrie rozlišujú na ortuťové a elektródy z tuhých kovov. Môžu mať rôzny tvar a rozmery. Pre niektoré elektroanalytické merania sa používajú mikroelektródy a ich súbory. [23]

2.2.1 Ortuťové elektródy

Z hľadiska elektrochemickej analýzy má ortuť ako elektródový materiál niekoľko významných predností:

- ortuť má široké rozmedzie teplôt, pri ktorých sa nachádza v tekutom stave ($-38,9^{\circ}\text{C}$ až $356,9^{\circ}\text{C}$ pri normálnom tlaku),
- povrch elektródy je homogénny a je možné ho ľahko obmeňovať (ortuťová kvapková elektróda), takže každá analýza môže prebiehať s novým reprodukovateľne obnoveným elektródovým povrchom,
- vysoká hodnota prepätia vodíka umožňuje pracovať s takouto elektródou v neutrálnych roztokoch pri veľmi negatívnych potenciáloch bez toho, aby bola reakcia prekrytá redukciou vodíkového iónu,
- tvorba amalgámu – zliatiny ortuti s iným kovom. [23; 29]

Voltametria s kvapkajúcou ortuťovou elektródou sa nazýva polarografia. Polarografická vlna registrovaná pri použití ortuťovej elektródy je typická prúdovými osciláciami, Obr. 2-2 A), ktoré môžu komplikovať odčítanie hodnoty limitného prúdu. Je možné ich eliminovať pomocou tast-polarografie, kedy sa prúd meria určitú dobu a pred ďalším odčítaním je hodnota držaná v pamäti. Metóda tast-polarografie zefektívňuje limit detekcie o jeden koncentračný rád oproti klasickej polarografii. Je naznačená na Obr. 2-2 B). [23]



Obr. 2-2 Polarografická vlna: A) oscilácie prúdu spôsobené odkvapkávaním ortuti, limitný prúd meraný v strede oscilácií, B) naznačenie metódy tast-polarografie [28].

Iným typom ortuťovej elektródy je ortuťová filmová elektróda. Príprava prebieha najčastejšie elektrolytickým vylúčením malého množstva ortuti na povrchu tuhej elektródy. Vylúčená ortuť vytvára na povrchu nosiča súbor mikroskopických kvapôčok, nie spojitý film. Takýto typ ortuťovej elektródy tak stráca výhodu ľahkého periodického obnovovania povrchu. Najlepší film vzniká pri deponovaní ortuti na irídiovú elektródu pre jej nízku rozpustnosť v ortuti a dobrú zmáčavosť. Zlato je oveľa viac rozpustné v ortuti a na uhlíkových elektródach je ortuť nanosená v mikrokvapôčkach. Odpoveď filmovej elektródy je vyššia než kvapkajúcej, avšak zároveň je filmová elektróda viac citlivá na substancie, ktoré môžu na povrchu blokovat' transfer náboja. [23; 30]

2.2.2 Elektródy z tuhých materiálov

Najbežnejšími materiálmi tuhých elektród sú platina, zlato a rôzne formy uhlíka. Elektródy z iných kovov, napr. striebra, wolfrámu, medi, či zriedkavo polymérov, sa používajú pre špeciálne účely, kedy sú vhodné špecifické vlastnosti daných materiálov. [30]

Platina a zlato sú používané pri elektródových reakciách v anodickom regióne. Platina je kov s výraznými elektrokatalytickými účinkami, elektrochemické reakcie na nej prebiehajú rýchlo. Zlato má všeobecne menšie elektrokatalytické účinky, z čoho vyplýva, že je menej náchylné voči katalytickým jedom. Z tohto dôvodu je použitie zlatých elektród preferované pred použitím platinových elektród pri voltametrických meraniach. Povrch zlatých elektród tiež ľahko podlieha oxidácii v prítomnosti aniónov pri aplikovaní pozitívneho napätia. Uhlíkové elektródy sa oproti predchádzajúcim

kovovým elektródam vyznačujú nižším zbytkovým prúdom, sú menej náchylné na oxidáciu povrchu a lacné. Pri aplikácii ortuťového filmu netvorí s ortuťou intermetalické zlúčeniny (amalgamy) a nerozpúšťajú sa v nej. [23; 31]

V porovnaní s ortuťovými elektródami je povrch elektród z tuhých materiálov nehomogénny. V priebehu merania tak môžu byť pokrývané oxidmi, filmami produktov elektródových reakcií, či látkami naadsorbovanými z analyzovaného roztoku. Tieto látky blokujú aktívny povrch elektródy, čo sa prejavuje pri opakovaných alebo kontinuálnych meraniach postupným znižovaním elektrického prúdu a to aj v roztokoch s rovnakou koncentráciou analytu. Z toho vyplýva, že na vlastnosti elektródy má vplyv samotný materiál, z ktorého je elektróda vyrobená, aj charakter predchádzajúcich dejov, ku ktorým na elektróde došlo, tzv. história elektródy. Voltametria s tuhými elektródami je považovaná za experimentálne náročnejšiu, než s elektródami ortuťovými. Z hľadiska dosiahnutia reprodukovateľnosti a spoľahlivosti výsledkov je potrebné elektródový povrch zbaviť nežiaducich látok. Čistiaci a aktivačný postup nie je univerzálny, závisí od materiálu elektródy, charakteru elektródových reakcií i zloženia analyzovaného roztoku. Kombinuje niekoľko krokov mechanického, chemického i elektrochemického čistenia elektródy pred samotným meraním i v jeho priebehu. [23]

Napriek tomu, pre voltametrickú analýzu majú elektródy z tuhých materiálov značný význam:

- v porovnaní s ortuťou je možné pracovať pri pozitívnych potenciáloch a stanovovať látky oxidáciou, čo sa využíva pri stanovovaní organických látok,
- je možné ich použiť v detektoroch, kde sa ortuť nemôže použiť z dôvodu jej skupenstva (napr. detekcia v mikroseparačných metódach, kontinuálne merania),
- sú kompatibilné s planárnymi technológiami a je možné ich vyrábať ako integrované obvody,
- je možné ich použiť vo forme mikroelektrod,
- na ich povrch je možné zámerne naviazať rôzne látky, predovšetkým za účelom zvýšenia selektivity stanovenia – tzv. modifikované elektródy,
- v mnohých aplikáciách nahrádzajú toxickú ortuť, ktorej použitie je pri elektroanalytických stanoveniach v niekoľkých štátoch zakázané. [23]

2.2.3 Mikroelektrody

Charakteristický rozmer elektrochemicky aktívnej časti elektród pre klasickú voltometriu a polarografiu je rádovo niekoľko jednotiek mm. Mikroelektrody

predstavujú elektródy malých geometrických rozmerov, rádovo desiatok až jednotiek μm . [23]

V elektroanalytickej chémii sú mikroelektródy využívané pre svoje malé rozmery i špecifické elektrochemické chovanie. Transport analytu k mikroelektróde je riadený sférickou difúziou. Tá dopraví v danom čase k povrchu elektródy viac analytu ako lineárna difúzia typická pre klasické mikroelektródy. Prúd tečúci mikroelektródou je tak vždy väčší, než by bol v danom čase prúd tečúci klasickou elektródou. [23]

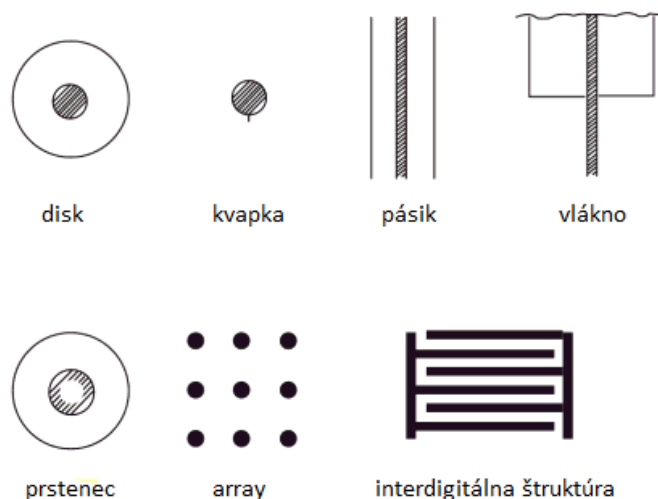
Voltametria tiež využíva nasledujúce vlastnosti mikroelektród:

- malý rozmer mikroelektródy umožňuje detekciu v malých priestoroch, čo je využívané pri in vivo meraní v rôznych tkanivách a organizmoch, tiež umožňuje použitie mikroelektród ako komponenty mikroanalytických zariadení vytváraných „na jednom čipe“,
- v dôsledku zmenšenia geometrickej plochy mikroelektródy dochádza k zredukovaniu kapacitancie systému, čo umožňuje rýchlo meniť potenciál mikroelektródy (napr. pri pulzných metódach),
- pri malých prúdoch tečúcich mikroelektródami sú úbytky napätia na odpore zanedbateľné, meranie je teda možné aj v málo vodivých rozpúšťadlách (napr. organické rozpúšťadlá, živé tkanivá, atď.),
- faradaický prúd – signál je priamoúmerný charakteristickému rozmeru elektródy a kapacitný prúd – šum je priamoúmerný ploche elektródy, vďaka čomu rastie podiel signál / šum s klesajúcim rozmerom mikroelektródy. [23; 32]

Mikroelektródy môžu mať rôzne tvary, ako je vidieť na Obr. 2-3. Rozlišujeme mikroelektródy:

- plošné – nevyčnievajú do roztoku, ktorý ich obklopuje, napr. diskové a pásikové,
- priestorové – sú obklopené roztokom z viacerých strán, napr. vláknové,
- sférické – napr. guľové a pologuľové.

Mikroelektródy je možné používať izolovane alebo združene v súbore s rôznym počtom, usporiadanosťou (periodicky usporiadané alebo náhodné), s použitím identických alebo rôznych tvarov a rozmerov. Prúd tečúci súborom mikroelektród je väčší, než by bola suma prúdov tečúcich jednotlivými izolovanými elektródami. [23]



Obr. 2-3 Bežne používané tvary a súbory mikroelektrod [23].

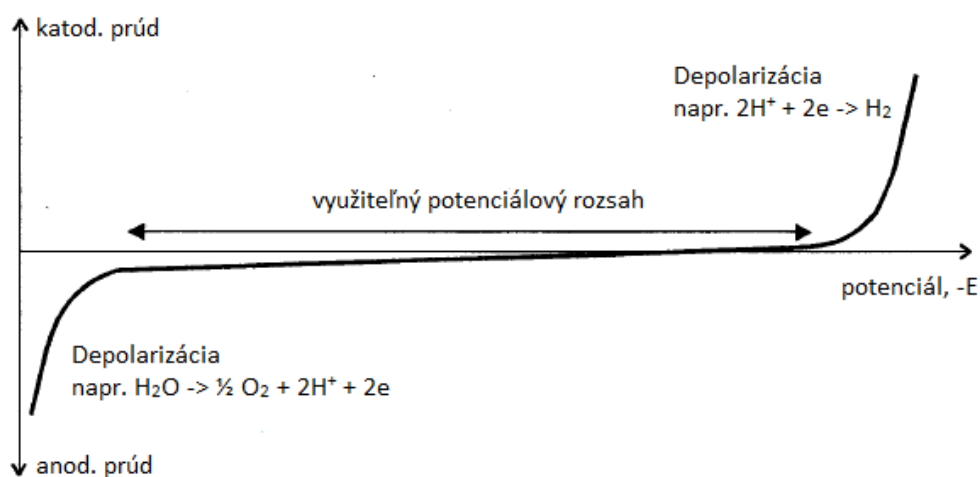
2.3 Analyzovaný roztok

Vo voltametrickom meraní sa k vzorke roztoku spravidla pridáva inertný elektrolyt, ktorý zaisťuje dostatočnú elektrickú vodivosť roztoku. Tento tzv. základný elektrolyt môže pozostávať napr. z minerálnych kyselín, hydroxidov, či neutrálnych solí ako napr. KCl alebo KNO_3 . Jeho koncentrácia je vždy podstatne vyššia, než koncentrácia analytu, čo spôsobuje, že je prúd medzi pracovnou a pomocnou elektródou sprostredkovaný predovšetkým iónmi tohto indiferentného elektrolytu. Nežiaduca migrácia iónov analytu je tak prakticky eliminovaná. [28]

Častým potrebným procesom je zbavenie analyzovaného roztoku rozpusteného kyslíka, ktorý sa redukuje na elektróde. Jeho prúd môže prekryť prúd analytu. Odstránenie kyslíka sa uskutočňuje prebublaním analyzovaného roztoku inertným plynom, najčastejšie dusíkom. [28]

2.4 Voltametrická krivka

Voltamogram alebo voltametrická krivka predstavuje závislosť prúdu tečúceho do polarizovanej pracovnej elektródy na jej elektrickom potenciáli. Je základom všetkých elektrochemických metód, pri ktorých článkom tečie elektrický prúd. Ukážka voltametrickej krivky je zjednodušene zobrazená na Obr. 2-4. Krivka je zakreslená podľa konvencie, t.j. záporný potenciál rastie doprava a záporný katodický prúd rastie smerom hore. [28]



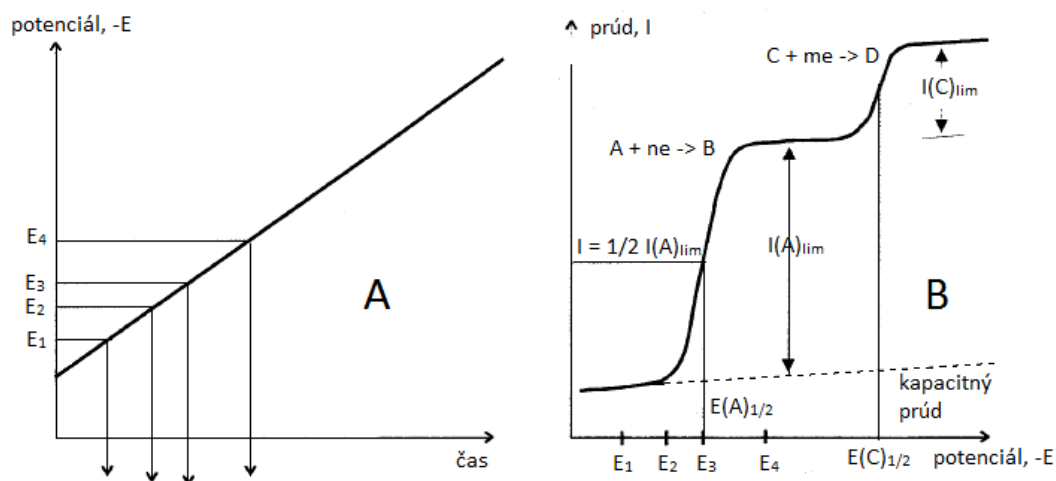
Obr. 2-4: Zjednodušená voltametrická krivka v základnom elektrolyte [28]

Schematicky zakreslená voltametrická krivka je registrovaná v roztoku základného elektrolytu pri lineárne s časom sa meniacom potenciáli vkladanom na pracovnú elektródu. Základný elektrolyt je volený tak, aby obsahoval látky, ktoré sa oxidujú a redukujú až pri vysokých hodnotách potenciálov pracovnej elektródy. Tak je elektróda polarizovaná v relatívne širokej oblasti potenciálu a tečie ňou iba malý nabíjací kapacitný prúd. Využitelný pracovný rozsah závisí na materiáli pracovnej elektródy, použitom základnom elektrolyte a rozpúšťadle. [28]

Depolarizátor pridaný do základného elektrolytu sa pri určitom potenciáli v oblasti využitelných potenciálov oxiduje alebo redukuje. Dochádza k depolarizácii elektródy, ktorou potečie pri oxidácii anodický a pri redukcii katodický prúd. Pri určitej hodnote potenciálu je rýchlosť redoxných reakcií natoľko vysoká, že je koncentrácia analytu na povrchu elektródy nulová a elektrický prúd už s ďalším zvyšovaním potenciálu nemôže rásť. Takýto prúd sa nazýva limitný a je priamoúmerný koncentrácii analytu v roztoku. Závisí tiež na type použitej pracovnej elektródy a spôsobe merania polarizačnej krivky. Závislosť elektrického prúdu na potenciáli má tvar vlny. Táto voltametrická vlna je charakterizovaná veľkosťou limitného prúdu (kvantitatívny údaj) a hodnotou tzv. polvlnového potenciálu (kvalitatívny údaj). Polvlnový potenciál je potenciál v bode, kedy sa elektrický prúd rovná polovici prúdu limitného. V tomto bode je analyt pri povrchu elektródy práve z polovice zredukovaný alebo zoxidovaný. [23]

Voltametricky je možné stanoviť rôzne anorganické, organické látky i viac látok v roztoku naraz. Na Obr. 2-5 je zobrazená časť polarizačnej krivky nameranej z roztoku, ktorý obsahuje dve látky A a C. Tieto sa redukujú pri rôznych potenciáloch. Pri potenciáli E_1 sa ešte žiadna látka v roztoku neredukuje, elektródou tečie kapacitný prúd.

Pri hodnote potenciálu E_2 sa začína redukovať látka A, v dôsledku čoho jej koncentrácia pri povrchu elektródy klesá a elektródou preteká faradaický prúd. So zvyšujúcim potenciálom E_3 rastie rýchlosť elektródovej reakcie. Čím viac látky sa na elektróde redukuje, tým viac rastie elektrický prúd, až do dosiahnutia svojej limitnej hodnoty. Ďalšie zvyšovanie potenciálu, E_4 , nemá vplyv na rast elektrického prúdu v dôsledku redukcie látky A z vyššie uvedených dôvodov. Elektrický prúd opäť začne rásť až pri dosiahnutí potenciálu, pri ktorom sa redukuje ďalšia látka v roztoku – látka C a dosiahne hodnoty limitného prúdu zodpovedajúce koncentrácii danej látky. Taktiež polvlnový potenciál bude charakteristický pre látku C. Voltametria teda umožňuje súčasné stanovenie viacerých látok v roztoku, pokiaľ sa dostatočne líšia hodnotami polvlnových potenciálov. [28]



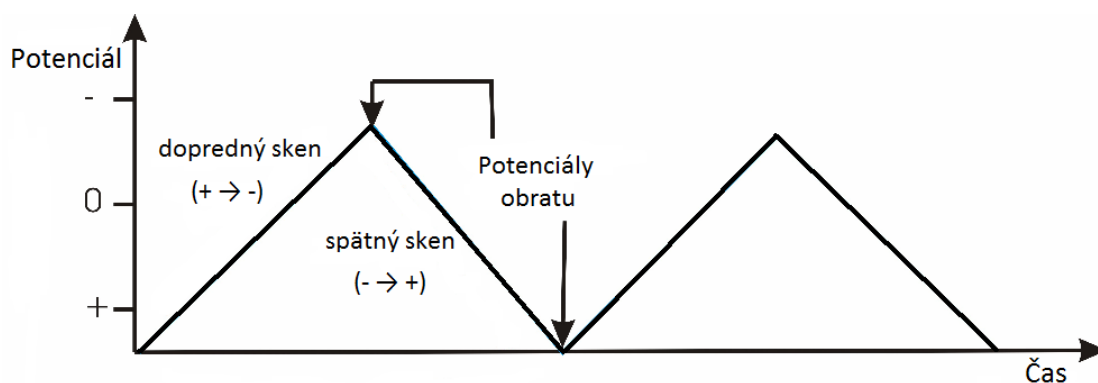
Obr. 2-5 Princíp voltametrickej analýzy: A) časový priebeh potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu; B) polarizačná krivka registrovaná v roztoku bez analytu (čiarkovaná krivka) a v roztoku s obsahom analytov A a C (plná krivka). [28]

Pri popise vzniku voltametrickej krivky je popísaná metóda voltametrie, kedy sa na pracovnú elektródu vkladá potenciál rastúci s časom, t.j. metóda „direct current“.

2.5 Cyklická voltametria

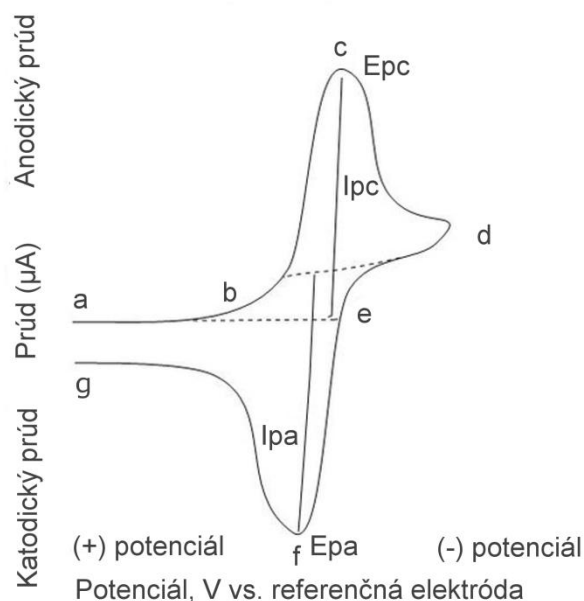
Cyklická voltametria je všestranná a jednoduchá elektroanalytická technika používaná v odboroch elektrochémia, anorganická a organická chémia, biochémia. Často predstavuje prvý experiment elektrochemickej štúdie zlúčeniny, biologického materiálu alebo elektródového povrchu. Účinnosť metódy spočíva v schopnosti rýchlo zaznamenať redoxné správanie v širokom potenciálovom okne. Najužitočnejším aspektom použitia metódy je kvalitatívna analýza elektródových reakcií, ktoré sú spojené s reakciami chemickými. [33]

Pri cyklickej voltametrii je na elektródu vložený potenciál s priebehom zobrazaným na Obr. 2-6. Spočiatku je potenciál lineárne zvyšovaný od počiatočného k zlomovému potenciálu, čo predstavuje tzv. dopredný sken, potom dochádza k obratu. Potenciál je znižovaný ku konečnému potenciálu ako tzv. spätný sken. Počiatočný potenciál je zvyčajne zhodný s konečným potenciálom. Dopredný a spätný sken tvoria jeden cyklus. Podľa potreby je možné aplikovať jeden alebo viac cyklov. Rýchlosť, s akou je potenciál menený, tzv. skenovacia rýchlosť, určuje časové okno experimentu. [34]



Obr. 2-6 Priebeh potenciálu cyklickej voltametrie [35].

Na Obr. 2-7: redukčný proces prebieha od a) počiatočného potenciálu k d) potenciálovému obratu. V danom regióne sa potenciál skenuje negatívne aby spôsobil redukciu. Výsledný prúd sa nazýva katodický prúd I_{pc} . Zodpovedajúca amplitúda napätia sa vyskytuje v bode c) a nazýva sa pík katodického napätia E_{pc} . E_{pc} je dosiahnuté, keď sa všetok substrát na povrchu elektródy zredukuje. Po dosiahnutí potenciálového obratu d), potenciál skenuje pozitívne, t.j. z d) do g). Výsledkom je anodický prúd I_{pa} a oxidácia. Potenciál píku v f) sa nazýva pík anodického potenciálu E_{pa} a je dosiahnutý, keď dôjde k oxidácii všetkého substrátu na povrchu elektródy. [33]



Obr. 2-7 Modelový voltamogram cyklickej voltametrie. Upravené z: [33]

Rysom cyklickej voltametrie je možnosť pri spätnom skene reoxidovať, či znovu zredukovať produkt, ktorý vznikol pri doprednom skene. Zo separácie píkovo vo voltamograme, ich tvaru, pomeru ich výšok a zmien daných parametrov so zmenou rýchlosti scanu je možné získať informácie o kinetike prenosu náboja a uskutočnených elektródových reakciách. Menej často sa metóda používa k samotnej analýze. Potenciál píku zodpovedajúci oxidácii adsorbovanej látky je rovnaký ako potenciál píku zodpovedajúci jej redukcii, symetrický podľa prúdovej osi. [23; 34]

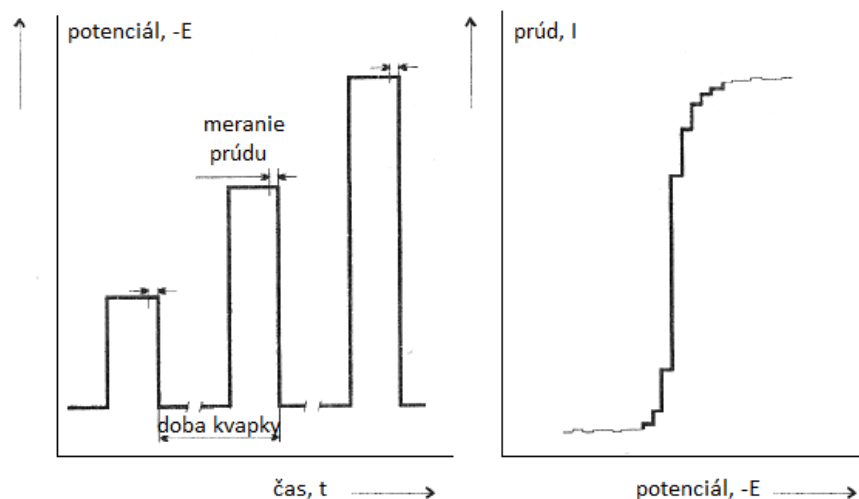
2.6 Pulzné metódy voltametrie

V praxi sú používané rôzne varianty voltametrických meraní, ktoré sa líšia spôsobom a tvarom potenciálového pulzu vkladaneho na pracovnú elektródu. Potenciál môže byť konštantný alebo zložitejšieho priebehu, premenný v čase podľa predvoleného nastavenia. [36]

Hlavnou charakteristikou pulzných metód je, že počas záznamu je meraný prakticky iba faradaický prúd, nakoľko kapacitná zložka prúdu (tzv. nabíjací prúd) z prevažnej časti odznela. Na základe toho umožňujú pulzné metódy stanovenie analytu pri koncentráciách až do $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vďaka zdokonaleniu prevedenia nahrádzajú moderné pulzné techniky klasickú polarografiu v analytických laboratóriách. [24]

2.6.1 Normálna pulzná voltametria

Pri normálnej pulznej voltametrii sú na elektródu vkladane elektrické pulzy o šírke rádovo desiatok ms s postupne rastúcou amplitúdou. Elektrický prúd sa vzorkuje na konci vloženého pulzu počas rádovo jednotiek až desiatok ms, ako je vidieť na Obr. 2-8. [23]

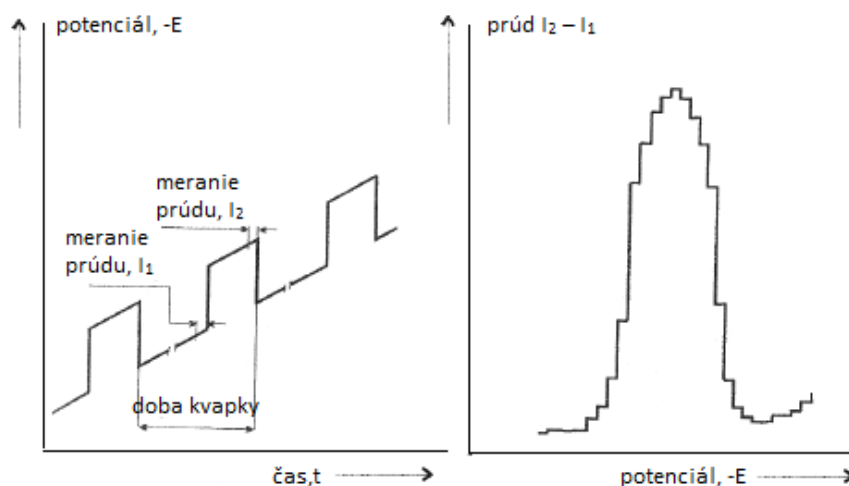


Obr. 2-8 Charakter vkladaneho potenciálu na elektródu pri normálnej pulznej voltametrii a registrovaná voltametrická krivka [23].

Metóda je vhodná pre použitie tuhých elektród, pretože elektróda je značnú časť analýzy na počiatočnom potenciáli, ktorý je možné zvoliť tak, aby pri ňom nedochádzalo k adsorpcii látok a tvorbe filmov. Napriek tomu je metóda analyticky úspešnejšia s použitím ortuťových elektród. [23]

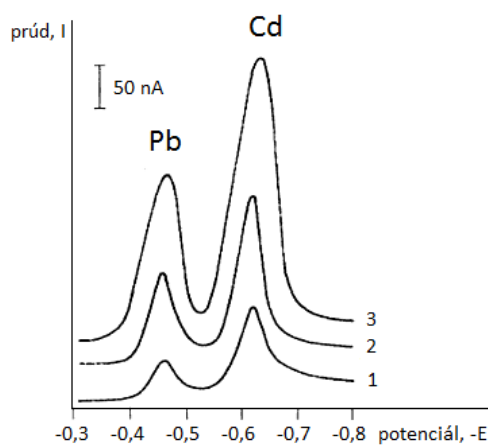
2.6.2 Diferenčná pulzná voltametria

Diferenčná pulzná voltametria patrí medzi najcitlivejšie pulzné metódy. Je charakteristická aplikovaním potenciálu, ktorý sa s časom lineárne mení a je prekladaný napäťovými pulzmi s amplitúdou 10 až 100 mV a dobou trvania desiatok ms. Zaznamenaný je rozdiel prúdov meraných tesne pred vložením pulzu a na jeho konci, čo zodpovedá dobe vzorkovania cca 10 – 100 ms. Závislosť rozdielu prúdov na potenciáli prechádza maximom a má tvar píku, ktorý demonštruje Obr. 2-9. [23; 37]



Obr. 2-9 Charakter vkladaneho potenciálu na elektródu pri diferenčnej pulznej voltametrii a registrovaná voltametrická krivka [23].

Potenciál píku na osi x je typický pre konkrétny analyt a amplitúda potenciálového píku závisí na koncentrácii analytu. Na tvar a potencial píku má tiež vplyv amplitúda aplikovaného napäťového pulzu, ako demonštruje Obr. 2-10 a jeho trvanie. [37]



Obr. 2-10 Zobrazenie vplyvu amplitúdy pulzu napätia na diferenčný pulzný voltamogram olova a kadmia, hodnoty amplitúdy pulzu napätia 1) -10 mV, 2) -25 mV, 3) -75 mV [37].

2.7 Výhody a nevýhody voltametrie

Z hľadiska analytických parametrov ako sú citlivosť, medza stanoviteľnosti, selektivita, správnosť, reprodukovateľnosť a z praktických charakteristík ako rýchlosť, cena, a pod. patria medzi výhody voltametrie:

- možnosť stanovenia širokého spektra zlúčenín a širokého koncentračného

- rozmedzia (od 10^{-3} do 10^{-12} mol·l⁻¹) pomocou jediného prístroja, ktorého zriaďovacie i prevádzkové náklady sú podstatne nižšie než prístroje na spektrochemické, či chromatografické metódy s porovnateľnými parametrami,
- možnosť stanovenia viac organických zlúčenín pomocou jedinej analýzy (pokiaľ sa polvlnové potenciály alebo píky potenciálov dostatočne líšia),
 - značne zvýšená rýchlosť stanovenia a možnosť automatizácie moderných voltametrických inštrumentácií,
 - nezávislá alternatíva pre stanovenie extrémne nízkych koncentrácií rôznych organických analytov, významná v súvislosti s požiadavkou legislatívy na analýzu vzoriek dvomi nezávislými technikami, tiež možnosť doplnenia informácie získanej modernými spektrometrickými a separačnými metódami. [23]

Medzi hlavné nevýhody voltametrie patria:

- nemožnosť dosiahnutia selektivity moderných separačných metód, kvôli čomu nebude samotná voltametria nikdy vhodná na analýzu mnohózložkových zmesí; vhodné je využitie voltametrie poskytujúcej nízku medzu stanoviteľnosti s vhodnou separačnou technikou,
- zvýšené požiadavky na pracovníkov analytických laboratórií kvôli potrebe dôkladného poznania procesov voltametrie. [23]

3 TEÓRIA MIKROFLUIDICKÝCH SYSTÉMOV

Bioanalytika predstavuje disciplínu analytickej chémie, ktorá sa zaoberá analýzou biotík – t. j. proteínov, lipidov, nukleových kyselín, metabolitov a xenobiotík – t. j. látok, ktoré sú pre telo cudzie, ako nap. liečivá, drogy a ich metabolity. Častým problémom pri analýzach je obmedzené množstvo skúmanej vzorky. Z tohto dôvodu je kladený dôraz na vývoj metód, ktoré by boli schopné analyzovať malé množstvá analytu a zároveň mali reprodukovateľné a robustné výsledky. Súčasťou vývoja je miniaturizácia systémov, ku ktorým patria analyzátory na báze mikrofluidických čipov, často označované ako „Micro Total Analysis System“ (μ -TAS). Vrcholom vývoja sú systémy „Lab-on-chip“ – laboratórium na čipe. [38]

Vývin μ -TAS je sústredený pre aplikácie v medicíne, forenzných vedách, pri environmentálnom monitorovaní, či vývoji liečiv. Systémy sú navrhované tak, aby fungovali ako analytické miniaturizované zariadenia schopné vykonávať všetky procesy analýzy vzorky. [4]

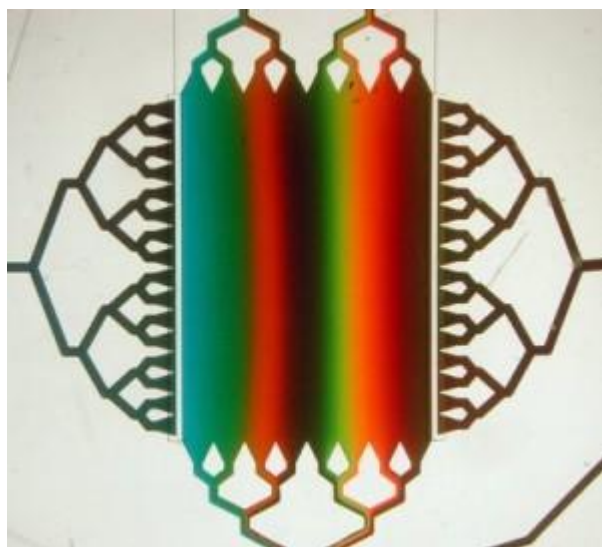
Mikrofluidika je veda a technológia systémov, ktoré sú schopné usmerňovať malé objemy kvapalín v ráde nanolitrov až attolitrov. K tomu sú využívané mikrofluidické platformy so systémami kanálov s veľkosťou niekoľkých mikrometrov – mikrokanaľov pripojených pomocou systému trubičiek k zásobníkom kvapalín. Hlavnými charakteristikami mikrofluidiky sú malé rozmery a laminárne prúdenie kvapalín v mikrokanaľoch. Mnohé experimenty môžu byť vďaka mikrofluidike uskutočňované rýchlo a paralelne, so spotrebou malých množstiev reagentov, t.j. so zvýšenou účinnosťou oproti existujúcim kvantitatívnym rozborom či separačným technikám. [39; 40; 41]

3.1 Prúdenie kvapaliny v mikrokanaľoch

Prúdenie kvapaliny sa rozlišuje na laminárne a turbulentné. Pri laminárnom prúdení je pohyb jednotlivých vrstiev tekutiny paralelný s pozdĺžnou osou trubice. Prietokový objem stúpa lineárne až do kritickej hodnoty, kedy sa v tekutine začínajú tvoriť víry a laminárne prúdenie prechádza do turbulentného. [42]

Správanie kvapaliny prúdiacej v mikrofluidickom systéme je odlišné od makroskopického. Mikrorozmery kanálov umožňujú efekty, ktoré v systémoch s makromierkami zvyčajne nie sú možné. Jedným z dôsledkov laminárneho prúdenia je

napr. to, že sa dva alebo viaceré prúdy zbiehajúce do spoločného, nebudú miešať. Pasívne prebiehajúca difúzia je v tomto prípade pomalá a takmer zanedbateľná. [43]



Obr. 3-1 Mikrofluidický systém naplnený rôznymi farbami pre zobrazenie toku kvapaliny prúdiacej zhora nadol. [44]

3.1.1 Reynoldsovo číslo

Kritický bod prechodu medzi laminárnym a turbulentným prúdením závisí na hodnote Reynoldsovho čísla, ktoré charakterizuje silové pomery v tekutinách a je dané vzťahom (3.1):

$$Re = \frac{\rho \cdot l \cdot v}{\eta}, \quad (3.1)$$

kde veličiny znamenajú: ρ – hustota kvapaliny [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$] a η – dynamická viskozita kvapaliny [$\text{Pa} \cdot \text{s}$], v – stredná rýchlosť kvapaliny [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] a l – charakteristický rozmer mikrokanála [m]. Kritická hodnota Reynoldsovho čísla zodpovedá hodnote cca 2300, prípadne rozmedziu 2100 – 2500. V mikrofluidike nadobúda Reynoldsovo číslo hodnoty rádovo desiatinných čísel, maximálne jednotiek, v dôsledku čoho sa uvažuje iba laminárne prúdenie kvapaliny. [45; 46]

3.1.2 Hagen-Poiseuillova rovnica

Počas prechodu kvapaliny mikrokanálom dochádza k tlakovému úbytku Δp [Pa], ktorý vzniká medzi dvoma koncami mikrokanála. Podľa Hagen-Poiseullovej rovnice pre mikrokanál v tvare valca (3.2) zodpovedá tlakový úbytok:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot \eta \cdot l \cdot Q}{\pi r^4}, \quad (3.2)$$

pričom veličiny znamenajú: η – dynamická viskozita kvapaliny [Pa·s], l – charakteristický rozmer mikrokanála [m], Q – objemový prietok [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$], r – polomer mikrokanála [m]. [47]

3.1.3 Kontrola toku v mikrokanáloch

U väčšiny systémov je potrebná optimalizácia transportu kvapaliny kanálom. Medzi najpoužívanjšie metódy patria:

- tlakové riadenie prietoku pomocou vloženia mikročerpadiel alebo s použitím externého čerpadla, prípadne syringe pumpy,
- transport založený na pohybe nabitých elektrických častíc v elektrickom poli,
- transport založený na manipulácii rozptýlených magnetických častíc v roztoku v magnetickom poli,
- elektroosmotický transport kvapalín s obsahom ionizovaných molekúl vzhľadom k mikrokanálom s fixným nábojom. [48; 49; 50]

Súčasťou mikrofluidických čipov sú tiež miniaturizované aktívne komponenty ako pumpy, ventily, mixéry, či sensory. Pumpy slúžia na poháňanie kvapaliny v kanáloch, prípadne dávkovanie kvapaliny. Ventily otvárajú a uzatvárajú mikrokanály alebo sa používajú k rozvádzaniu prúdu tekutiny, kedy vychyľujú kvapalinu vytekajúcu z napájacej trysky. V prípade potreby miešanie kvapalín sú mixéry nevyhnutné z dôvodu pomalej difúzie v dôsledku absencie turbulencie. Systémy tiež môžu obsahovať senzory, napr. na tlak, teplotu, či rýchlosť toku. [51; 52; 53; 54; 55]

3.2 Materiály na výrobu mikrofluidických systémov

Pôvodnou myšlienkou pri výrobe mikrofluidických systémov bolo priame aplikovanie materiálov a techniky výroby použitých pre výrobu mikroelektroniky a v mikroelektromechanických systémoch. Prvé systémy boli preto zhotovené z kremíka a skla. [40]

3.2.1 Kremík a sklo

Kremík je ako materiál relatívne drahý a nepriehľadný, nepoužiteľný s konvenčnými optickými metódami. Výhodami skla sú dobre známe metódy výroby, transparentnosť umožňujúca optickú detekciu, výborné izolačné vlastnosti a chemická odolnosť. Z hľadiska ceny výroby sú kremík a sklo nevhodné pre komerčnú produkciu. Pri výrobe špecializovaných systémov, ktoré vyžadujú chemickú a tepelnú stabilitu,

však majú uplatnenie. Príkladom aplikácie materiálov je nanofluidika – prúdenie kvapaliny v pevných kanáloch s ideálne menej ako 50nm rozmermi. [4; 40; 56]

3.2.2 Polymérne materiály

Polyméry predstavujú dlhé reťazce získané polymerizáciou, t.j. syntézou, pri ktorej sa makromolekulové látky zhlukujú do väčších celkov bez vzniku vedľajšieho produktu. Vnútorne usporiadanie polymérov je amorfné alebo čiastočne kryštalické. [57]

Široké spektrum polymérnych materiálov poskytuje možnosť voľby materiálu zohľadňujúc vlastnosti pre špecifickú aplikáciu a výrobný proces, často pri nižšej cene oproti kremíku a sklu. [56]

Pri výbere polymérneho materiálu k výrobe mikrofluidických systémov je potrebné zohľadniť charakteristické vlastnosti:

- teplota skleného prechodu: tepelný rozsah, v ktorom sa polymér mení z tuhého sklovitého na mäkký; závislá na vnútornej štruktúre polyméru,
- teplota topenia: stredná hodnota oblasti, pri ktorej polymér prechádza do kvapalného stavu; závislá na dĺžke polymérových reťazcov a silách medzimolekulárnych väzieb,
- koeficient tepelnej rozťažnosti: zmenu v dĺžke alebo objeme polyméru ako následok zmeny teploty,
- tvrdosť materiálu: meranú ako zárez, ktorý vznikne pri použití špecifickej sily. [56]

S ohľadom na fyzikálne parametre a výrobu mikrofluidického systému sa polyméry delia na:

- reaktoplasty, starší názov termosety: vznikajú zosieťovaním, t.j. vytvrdzovaním počas zahrievania alebo vystavenia dostatočne vysokým dávkam svetla, za vzniku nepodajnej trojrozmernej siete; po vytvrdnutí zostávajú tvrdé aj pri opätovnom ohreve; napr. rezistory pre litografické metódy, polyimidy,
- termoplastické materiály: vykazujú zreteľné zmäkčenie pri dosiahnutí teploty v rozmedzí teploty skleného prechodu, kedy sa stávajú dobre spracovateľnými; môžu byť pretvarované viackrát opätovným zohriatím; napr. polymetylmetakrylát (PMMA), polykarbonát (PC), cykloolefinové polyméry a kopolyméry (COP a COC),
- elastoméry: ich molekulárne reťazce sú oproti predchádzajúcim typom dlhšie a fyzicky, väčšinou nie chemicky, zapletené; pri pôsobení vonkajšej sily sa reťazce roztiahnu a polymér sa elasticky natiahne, po ukončení pôsobenia sily

stiahne späť do pôvodného tvaru; primárny materiál z dôvodu relatívne nízkej ceny, ľahkej manipulácie, permeability pre kyslík a oxid uhličitý, t.j. vyhovujúci pre bunkové systémy; napr. polydimetylsiloxan (PDMS). [58]

3.3 Techniky výroby mikrofluidických systémov

Voľba techniky pre výrobu mikrofluidických systémov zahŕňa zohľadnenie zvoleného materiálu, aplikácie, výhod a nevýhod konkrétnej techniky. Kremík je možné obrábať suchým alebo mokrým, izotropickým alebo anizotropickým leptaním. Litografické metódy sú založené na prenose vzoru podľa masky na vybraný povrch. Pri často používanej fotolitografii dochádza k ožiareniu fotoreaktívneho materiálu svetlom, ktoré vyvolá chemickú reakciu. Pri vyvolaní je odstránená ožiarená alebo neožiarená časť fotorezistu. „Soft“ litografiou sú vyrábané mikrofluidické systémy z elastomérov, najčastejšie PDMS. Vzor môže byť na polyméry prenesený tiež pomocou otláčenia mikroobrobenej kovovej masky pri aplikovaní tepla a vysokého tlaku. Ďalšími metódami sú laserová ablácia, „Computer numerical control“ (CNC) mikroobrábanie atď. [55; 48; 56]

K vytvoreniu plne funkčného mikrosystému je potrebné uzavretie mikrokanálov bez zmeny fyzikálnych parametrov, dĺžky a zrútenia mikrokanálov. Spojenie môže byť zabezpečené adhezivami, solventmi, aplikáciou tepla a tlaku, zvarením, či pomocou rôznych modifikácií povrchu. [59; 60]

3.4 Výhody mikrofluidických systémov

V porovnaní s makrosystémami majú mikrozariadenia niekoľko výhod:

- redukcia veľkosti,
- redukcia spotreby vzoriek a reagentov spojená so zníženou produkciou odpadu,
- zefektívnenie výkonnosti analýzy – vyššia rýchlosť a lepšia presnosť (napr. vďaka krátkej difúznej vzdialenosti, rýchlemu zahrievaniu, paralelným analýzám niekoľkých vzoriek na jednom systéme),
- zníženie celkovej ceny analýzy vďaka masovej produkcii a pomerne lacným materiálom, ktoré môžu byť použité pri výrobe mikročipov na jedno použitie,
- kompaktnosť systémov, mobilita a jednoduché zaobchádzanie,
- nižšia spotreba energie atď. [4]

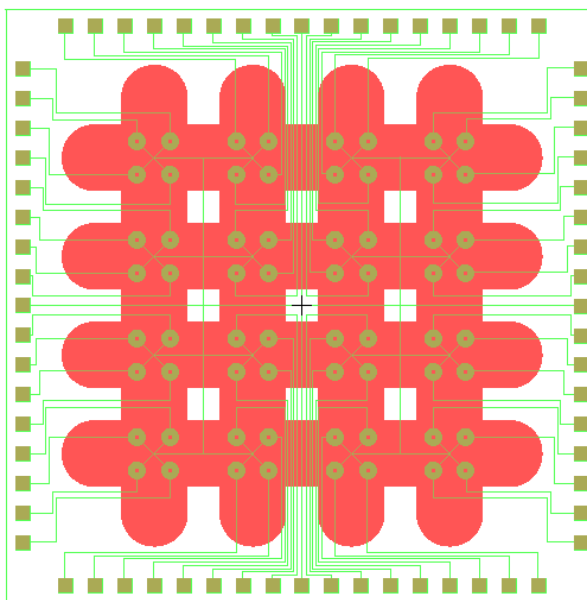
Teoretické základy a technologické postupy mikrofluidiky sú známe. Napriek tomu, je z hľadiska komercializácie mikrofluidika v počiatočnom štádiu rozvoja. Do budúcnosti má potenciál ovplyvniť, prípadne nahradiť, niektoré tradičné chemické syntézy, či biologické analýzy, priniesť rozvoj kvantitatívnych rozborov v domácom alebo nemocničnom prostredí v skorom štádiu choroby. [40; 61]

4 METODIKA DETEKČIE BIOMARKEROV

Ku detekcii biomarkerov pomocou elektrochemických metód bude použitý elektrochemický čip s mirofluidickým systémom na distribúciu analytu a „application-specific lab-on-a-chip“ (ASLOC) systém. [62].

Do systému bude dodávané externé napätie v tvare symetrickej píly, typické pre základnú voltametrickú metódu cyklickú voltametriu. Tento signál bude modifikovaný superponovaním štvorcových pulzov pre diferenčnú pulznú voltametriu. Výsledkom voltametrických meraní bude registrovaná voltametrická krivka (podrobne popísaná v podkapitole 2.4), ktorá obsahuje kvalitatívny i kvantitatívny údaj o sledovanom analyte, vďaka čomu bude možné hodnotiť namerané dáta.

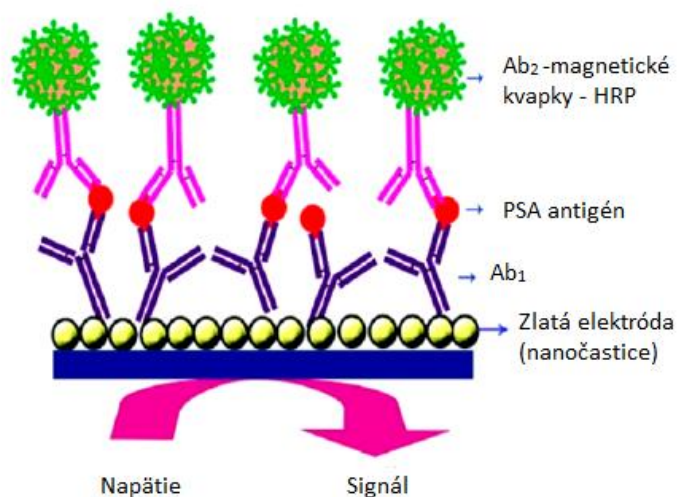
Elektrochemický čip pozostáva zo 16 zhlukov, pričom každý zhluk obsahuje 4 elektrochemické bunky. Mikrofluidický systém tvorí zostava 4 paralelných a 4 vertikálnych kanálov, ako je vidieť na Obr. 4-1. Návrh metodiky merania vychádza z predpokladu, že vďaka mikrokanálom bude možné funkcionalizovať elektrochemické bunky v každom rade iným „cross-linkerom“. Stĺpcami potom budú pretekať rôzne vzorky s obsahom biomarkerov. Tak bude možné detekovať 4 rôzne biomarkery súčasne. Elektrochemické bunky v jednom zhuku sú merané súčasne, ale nezávisle od seba, čo umožňuje odhalenie prípadnej chybovej elektrochemickej bunky.



Obr. 4-1 Návrh mikrokanálov na elektrochemickom čipe v programe L-Edit

K meraniu s mikrofluidickým čipom je vybraný biomarker PSA z dôvodu reálneho použitia pri skríningu karcinómu prostaty. V sére pacientov sa biomarker nachádza v malých koncentráciách. Z tohto dôvodu je zvolené použitie imobilizácie povrchu pracovnej elektródy pomocou protilátky pre naviazanie PSA s vytvorením špecifickej väzby antigén – protilátka.

Primárna protilátka (Ab_1) bude imobilizovaná na povrch elektródy. Na takto upravený povrch sa zachytí proteínový analyt – biomarker PSA. Z dôvodu zosilnenia signálu nasleduje pridanie sekundárnej protilátky a elektrochemická detekcia. Na sekundárnu protilátku (Ab_2) môže naväzovať napr. enzým, nanočastice, komplex biotín/streptavidín/enzým, kvantové bodky, či enzymaticky modifikované nanotrúbice. Obr. 4-2 zobrazuje grafické znázornenie naviazania PSA na zlatú elektródu väzbami antigén – protilátka s naviazanými magnetickými kvapkami na sekundárnu protilátku. [18]



Obr. 4-2 Imunosenzor na zlatej elektróde [18].

5 PDMS MIKROFLUIDICKÝ SYSTÉM

Pre výrobu mikrofluidického systému bol zvolený materiál polydimetylsiloxan Sylgard® 184 (PDMS) (Dow Corning). Tento polymér je bežne používaný pri výrobe prototypov mikrofluidických systémov metódou „soft“ litografia, ktorá sa vďaka tomu stala najčastejšie používanou metódou pri výrobe mikrofluidických systémov. [61]

Samotná výroba mikrofluidického systému zahŕňa kroky:

- dizajn mikrokanálov,
- vytvorenie reliéfu s negatívnym vzorom mikrokanálov, ktorý slúži ako matrica pre prípravu PDMS čipu,
- samotná príprava čipu,
- uzavretie kanálov spojením čipu s podkladovým materiálom,
- napojenie čipu na systém trubičiek a púmp nasledované testovaním systému.

5.1 Charakteristika PDMS

PDMS má niekoľko výhodných vlastností pre výrobu mikrofluidických systémov:

- pomerne rýchla, lacná a dostupná výroba v prípade výroby menšieho počtu systémov, nakoľko nie je potrebné pracovať v čistých priestoroch,
- optická transparentnosť až do 280 nm,
- netoxickosť; bunky cicavcov môžu byť kultivované priamo na materiály a systémy môžu byť implantované in vivo,
- reverzibilná deformácia,
- systémy s rôznymi rozmermi a tvarmi sú limitované iba matricou, podľa ktorej sú pomocou „soft“ litografie vytvárané,
- možnosť reverzibilného spojenia medzi dvomi kusmi PDMS, prípadne PDMS so širokou škálou iných materiálov a nereverzibilného spojenia vystavením kyslíkovej plazmy za vytvorenia kovalentných väzieb,
- možnosť meniť povrchové vlastnosti, napr. upraviť hydrofóbny povrch na hydrofilný,
- kompletná a relatívne rýchla degradovateľnosť v prírodných podmienkach, vďaka čomu PDMS nepredstavuje závažný environmentálny problém. [63; 64]

5.2 Dizajn mikrofluidických kanálov

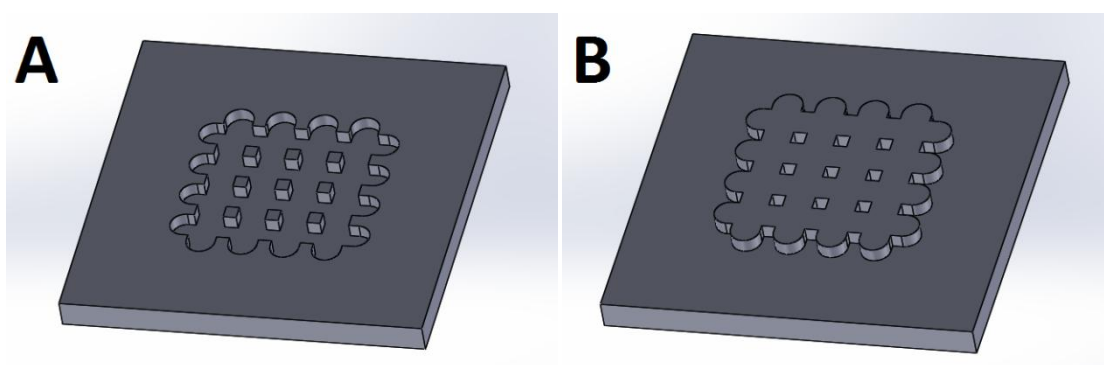
Pri návrhu mikrofluidických kanálov bolo zohľadnené, že sa výsledná mikrofluidická platforma spojí s elektrochemickým čipom a stane sa tak súčasťou systému „laboratória na čipe“. Rozmery a tvar kanálov musia byť navrhnuté s ohľadom na zabezpečenie pretekania kvapaliny:

- cez povrch všetkých elektrochemických buniek,
- s minimalizáciou mŕtveho priestoru v kanáloch,
- s ohľadom na ponechanie priestoru v kanáloch pre spojenie s externým systémom trubičiek privádzajúcich a odvádzajúcich kvapalinu z mikrofluidického čipu,
- s charakterom laminárneho prúdenia,
- tak, aby bola možná detekcia aspoň 4 rôznych biomarkerov.

Podmienky spĺňa dizajn systému s horizontálnymi a vertikálnymi kanálmi zobrazený na Obr. 4-1. Zvolená šírka kanála 2 mm umožňuje pokrytie celého zhluku elektród. Dĺžka kanála 14 mm zabezpečuje dostatok priestoru pre napojenie trubičiek mimo oblasť elektrochemických buniek, ktoré by mohli byť pri manipulácii poškodené. Vznik mŕtveho priestoru je eliminovaný zaguľatením začiatku a konca kanálov. Pre zabezpečenie laminárneho prúdenia kvapaliny je potrebné splnenie podmienky nízkej hodnoty Reynoldsovho čísla. To je možné doceliť nastavením pomalého pretekania kvapaliny cez systém kanálov a minimalizáciou rozmerov kanálov. Preto je zvolená výška kanálov 20 μm . Každý rad elektrochemických buniek môže byť navyše funkcionalizovaný rôznym „cross-linkerom“ pre biomarker a zároveň stĺpcami môžu pretekať vzorky 4 rôznych roztokov.

5.3 Výroba kremíkovej matrice pre PDMS

Kremíková matrica, negatív mikrofluidických kanálov (Obr. 5-1B), slúži k prenosu požadovaného vzoru kanálov (Obr. 5-1A) na PDMS. K výrobe matrice bol použitý kremíkový wafer s priemerom ≈ 100 mm, kryštalografickou orientáciou $\langle 100 \rangle$ a $1,8\mu\text{m}$ vrstvou SiO_2 . Zvolená metóda „soft litografia“ prebehla s použitím pozitívneho rezistu, tzn., že pri vyvolaní bola odstránená osvetlená časť rezistu. Po litografii nasledovalo odstránenie oxidu na miestach, ktoré neboli chránené rezistom a mokré leptanie kremíka v KOH.



Obr. 5-1 Model zobrazujúci A) PDMS mikrofluidický čip a B) kremíkovú matricu ako negatív ku výsledným mikrofluidickým kanálom

5.3.1 Príprava substrátu

Pred procesom litografie bolo potrebné dôkladne očistiť kremíkový wafer. Hrubé očistenie zahŕňa utretie povrchu hubkou, predtým ponorenou do saponátu a následný oplach destilovanou vodou. Jemné čistenie prebieha vložением waferu do prístroja „spin coater“ (SPS Spin 150 Spin Coater) a pri otáčkach nastavených na 3500 rpm postriekaním 4x po dobu cca 30 sekúnd izopropylalkoholom a 1x trichlóretylénom. Posledných 30 sekúnd sa wafer otáča bez oplachovania, aby vyschol.

Očistený wafer bol na 10 minút položený na horúcu platničku s teplotou nastavenou na $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následne vložený do exikátora s parami hexametyldisilazanu (HMDS) (Sigma), 98 % na čas 5 minút. Aplikácia HMDS zabezpečí zlepšenie adhézie rezistu na wafer. [65]

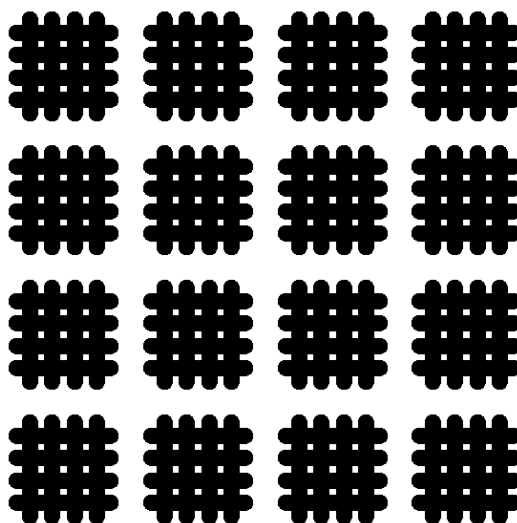
5.3.2 „Soft“ litografia

Prvý krok litografie predstavoval naniesenie fotorezistu, polymérnej látky citlivej na špecifický druh žiarenia, na čistý wafer. Proces prebiehal pri dvojkrokovom nastavení

prístroja „spin coater“. Prvá doba mala nastavenie trvania na 3 s, veľkosti otáčok 500 rpm a zrýchlenia otáčok $1000 \text{ rpm} \cdot \text{s}^{-1}$. Druhá doba mala nastavenie trvania na 20 s, veľkosť otáčok 3000 rpm a zrýchlenie otáčok $1000 \text{ rpm} \cdot \text{s}^{-1}$. Pozitívny fotorezist S1813 (Microposit) bol aplikovaný do stredu waferu, odstredivé sily spôsobili jeho rozliatie po celom povrchu. Viskozita a hrúbka nanesej vrstvy boli dané typom použitého fotorezistu. [66]

Tzv. „pre-bake“ proces alebo sušenie fotorezistu s úplným vyparením rozpustnej zložky, trvalo 60 s na horúcej platničke pri teplote nastavenej na 95°C . Prekročenie teplotného limitu fotorezistu by spôsobilo neželané zosieťovanie fotorezistu. Počas ďalších 180 s sa wafer chladil na pokojovú teplotu.

Na základe dizajnu z prostredia L-Edit (Obr. 5-2), spoločnosť G5 – studio s.r.o. vyrobilo masku pre osvit fotorezistu. Prvá verzia osvitovej masky obsahovala 16 kópií dizajnu mikrofluidických čipov na jednom wafri. Správne orientovaný wafer voči vyrobenej maske bol vložený do obojstrannej osvitovej jednotky s vakuom AZ210 (Mega Electronics). Počas 100s expozície UV svetlom s vlnovou dĺžkou 390 – 405 nm fotoaktívna zložka narušila polymérne väzby nezakrytých častí fotorezistu.



Obr. 5-2 Dizajn mikrofluidických kanálov v programe L-Edit pre výrobu kremíkovej matrice

Ďalej nasledovalo pečenie waferu na horúcej platničke s teplotou nastavenou na 110°C v čase 2 minút. Tento úkon, tzv. „post exposure bake“ zabezpečuje ostré hrany fotorezistu. Ku vybranému fotorezistu S1813 bola použitá vývojka MF-322 (Microposit). Wafer bol najprv ponorený do 100%vývojky na 160 s, potom do 50%vývojky objemovo nariadenej demineralizovanou vodou, následne opláchnutý demineralizovanou vodou a ofúkaný kompresným vzduchom. Zatiaľ čo kanály zostali chránené fotorezistom, tzv. ostrovčeky, boli pri procese vyvolania motívu odleptané.

Pre metódu „soft“ litografie boli použité konzultované postupy a doporučené nastavenia prístrojov i trvania postupných krokov bežne používané v laboratóriu LabSensNano na Ústave mikroelektroniky VUT v Brně a dostupné datasheety chemikálií.

5.3.3 Leptanie oxidu kremíka

Po litografii nasledovalo odstránenie vrstvy SiO_2 na miestach, ktoré neboli chránené rezistom. Na leptanie SiO_2 bol použitý roztok „buffered oxide etch“ (BOE), pripravený z 80 g NH_4F , 120 ml demineralizovanej vody a 20 ml 49% HF. Fluorid amónny v roztoku umožňuje kontrolovať proces, pretože znižuje rýchlosť leptania. Rýchlosť leptania oxidu s použitím BOE je $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ pri teplote 20°C . Použitý kremíkový wafer má $1,8 \mu\text{m}$ vrstvu SiO_2 , preto by mal byť za daných podmienok leptaný 18 minút. Proces je možné vizuálne kontrolovať, nakoľko kremík je hydrofóbny a SiO_2 hydrofilný. [67]

Proces leptania prebiehal v priestore digestora vo vaničke naplnenej BOE za jej občasného pohýbania v snahe obmeniť roztok okolo waferu. Doba leptania sa po optickej kontrole predĺžila na 22 minút a 15 s. Wafer bol opláchnutý demineralizovanou vodou a osušený ofúkaním dusíkom. Pri práci s HF boli použité ochranné pomôcky a po ukončení práce bolo vybavenie použité k práci s HF a samotné pracovisko neutralizované vodným roztokom CaCl_2 .

5.3.4 Leptanie kremíka

Pred samotným mokrým leptaním kremíka v KOH bol z wafera odstánený rezist. Ten by sa totiž pri procese leptania rozpustil v KOH a kontaminoval ho. K odstráneniu rezistu bol použitý dimetylsulfoxid (DMSO) (Penta).

Vzhľadom na požadovaný výsledný tvar mikrofluidických kanálov a technickú dostupnosť prebehlo leptanie kremíka metódou mokrého leptania v KOH. Výsledné trojdimenzionálne kanály mali po anizotropickom leptaní lichobežníkový tvar naznačený na Obr. 5-3B. [56]

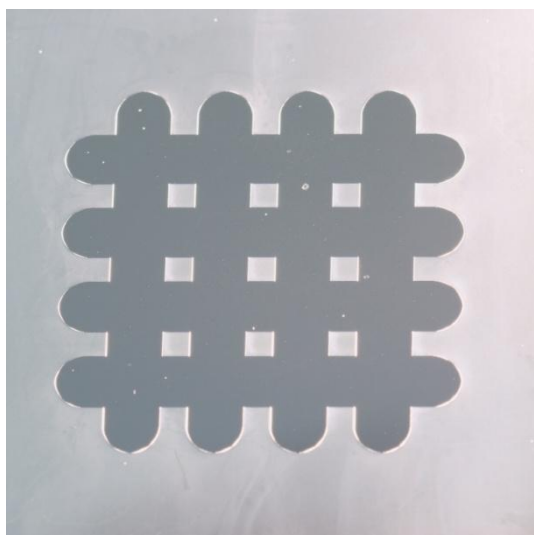


Obr. 5-3 Ilustrácia profilov leptaných A) izotropicky (napr. v zmesi HF, HNO_3 a CH_3COOH)

a B) anizotropicky (napr. v KOH, NaOH, CeOH, RbOH) [68]

Leptanie kremíka prebiehalo dynamicky, s použitím aparatury zostavenej špeciálne pre daný účel. Wafer uchytý v držiaku bol otáčaný v uzavretej teflonovej nádobe naplnenej 30% KOH s teplotou nastavenou na 80 °C. Leptacia rýchlosť kremíka s orientáciou <100> je za daných podmienok 77 μm za hodinu. Podľa tohto poznatku by malo byť požadovaných 20 μm kremíka vyleptaných v priebehu cca 16 minút. Vyleptaná hĺbka kanála bola kontrolovaná na profilometri DektakXT (Bruker) s hrotom s polomerom krivosti 2 μm a silou hrotu 7 mg. K dosiahnutiu uspokojivého výsledku bolo potrebné leptanie v KOH predĺžiť na celkových 22 minút a 15 s. Tento jav pravdepodobne nastal z dôvodu, že vloženie kremíkoveho wafera ochladilo roztok KOH a spomalilo tak proces leptania. [69]

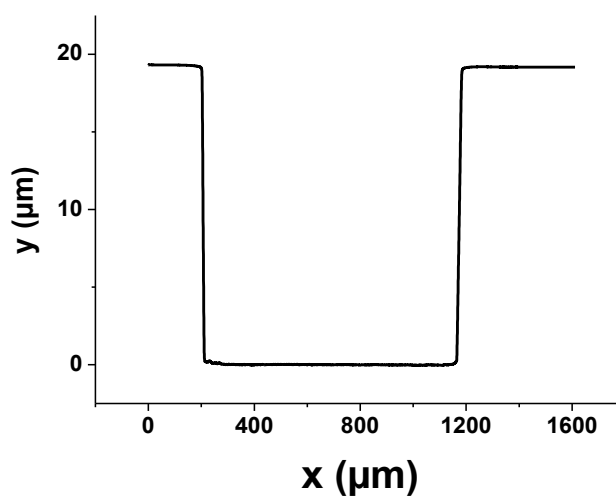
Na obrázku Obr. 5-4 je zobrazený 1 zo 16 matric mikrofluidických čipov na kremíkovom waferi.



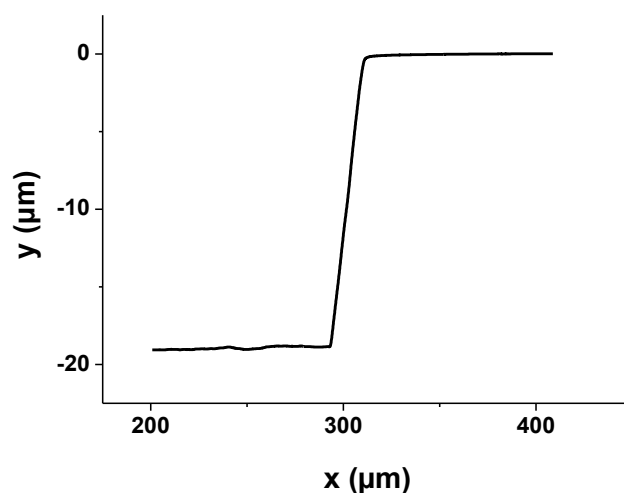
Obr. 5-4 Matrica mikrofluidického čipu pre výrobu PDMS čipu s vyleptanou vrstvou kremíka cca 20 μm (svetlo-šedá farba)

5.3.5 Kontrola vyrobenej matrice

Parametre vytvorenej kremíkovej matrice pre výrobu PDMS mikrofluidického čipu boli opäť skontrolované na profilometri DektakXT (Bruker) s hrotom s polomerom krivosti 2 μm a silou hrotu 7 mg. Mokrým leptaním KOH vznikli v kremíku štruktúry s priemernou hĺbkou cca 19,24 μm , čo je pre plánované použitie oproti požadovaným 20 μm dostačujúce. Na Obr. 5-5 je znázornený profil leptania. Na Obr. 5-6 je zobrazený profil s detailom na hranu s miernym sklonom, ktorá potvrdzuje anizotropický typ leptania.

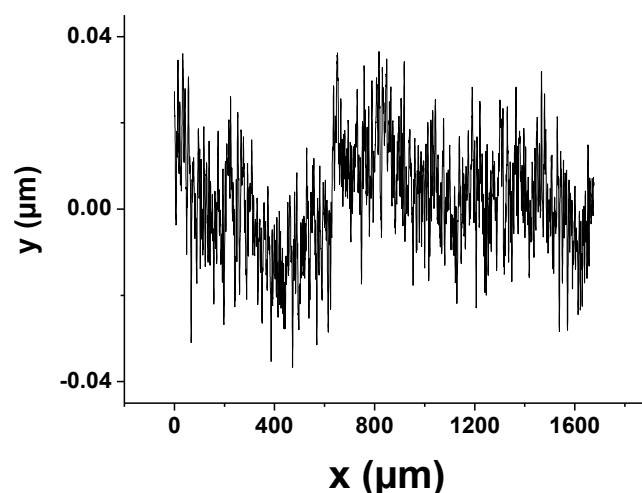


Obr. 5-5 Profil matrice zobrazujúci povrch štruktúr pre výrobu dvoch mikrofluidických kanálov (vyššie štruktúry) a tzv. ostrovčeka (unížená časť)

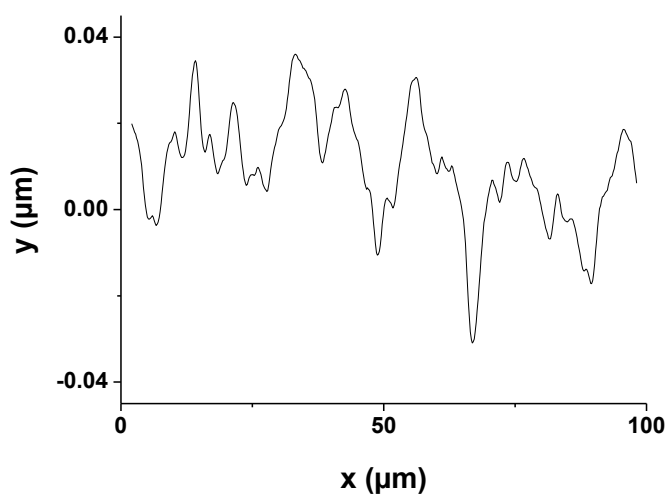


Obr. 5-6 Detail profilu matrice zobrazujúci prechod povrchu štruktúr pre výrobu tzv. ostrovčeka (unížená časť) a mikrofluidického kanála (vyvýšená štruktúra)

Na profilometri bola overená tiež drsnosť povrchu, ktorý vznikol leptaním v KOH. Na Obr. 5-7 je znázornený profil drsnosti povrchu pre dĺžku 1600 μm , na Obr. 5-8 detail pre dĺžku 100 μm . Pre získaný povrch bola vyhodnotená hodnota „root mean square“ (RMS) ako odmocnina aritmetického priemeru mocnín množiny čísel. Nízka hodnota 0,01 μm značí, že odchýlky vo vyleptanom povrchu sú veľmi malé.



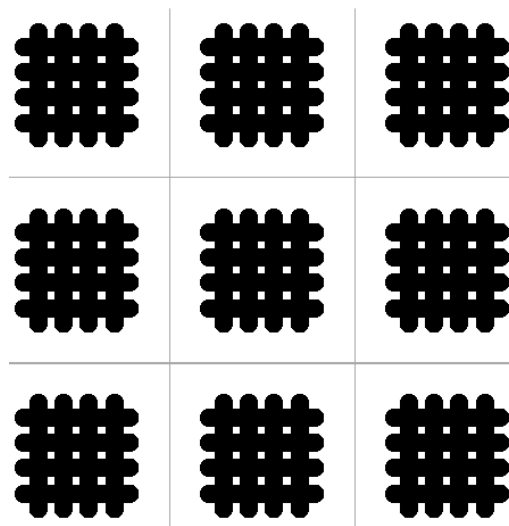
Obr. 5-7 Profil leptaného povrchu kremíkoveho waferu



Obr. 5-8 Detail profilu leptaného povrchu kremíkoveho waferu

5.4 Výroba II. generácie kremíkovej matrice pre PDMS

Druhá verzia dizajnu pre výrobu matrice bola po predchádzajúcich skúsenostiach práce s prvou vyrobenou matricou upravená. Počet kópií mikrofluidických čipov na osvitovej maske bol znížený zo 16 kusov na 9 tak, aby boli okraje kremíkovej matrice voľné pre manipuláciu a vzniklo viac miesta medzi samotnými čipmi. Do dizajnu boli pridané oddeľovacie línie medzi jednotlivými čipmi, ktoré budú uľahčovať orientáciu pri rezaní PDMS čipu (Obr. 5-9).



Obr. 5-9 Dizajn mikrofluidických kanálov v programe L-Edit pre výrobu II. generácie kremíkovej matice

Výroba matrice prebiehala podľa postupu popísaného v kapitole 5.3. Štruktúry matrice mali priemernú hĺbku cca 20,389 μm .

5.5 Výroba PDMS mikrofluidického čipu

PDMS mikrofluidický čip bol pripravený za použitia Sylgard 184 silikónového elastoméru, dodávaného v dvojzložkovom kite. Zmiešané zložky spolu zreagovali a vytvrdením vznikol elastický pevný materiál so vzorom použitej matrice. Tento bol následne odlúpaný od matrice a narezaný na jednotlivé čipy.

Do PDMS boli vyvŕtané diery pre prívod a odvádzanie kvapaliny. Na uzavretie štruktúr bolo zvolené použitie kyslíkovej plazmy aplikované na PDMS kanáliky a kontaktný materiál sklo.

5.5.1 Príprava PDMS

Podľa odporúčania výrobcu boli zložky Sylgard 184® namiešané v pomere 10 dielov predpolymérovej bázy a 1 diel spojovacieho vytvrdzovacieho činidla. Počas 3 minút premiešavania zložiek vznikli v zmesi nežiadúce vzduchové bubliny. Nevytvrdená zmes bola za čas cca 10 minút odplynená vo vákuovej komore. Kremíková matrica pre PDMS bola vložená do Petriho misky obalenej alumíniovou fóliou, z dôvodu jednoduchšej manipulácie s výsledným produktom. Nevytvrdená odplynená zmes bola následne naliata na matricu v množstve cca 30 g.

Vytvrdenie PDMS prebiehalo na horúcej platni nastavenej na teplotu 60 °C v čase

cca 2 hodín. Proces vytvrdenia by sa uskutočnil aj pri ponechaní zmesi pri pokojovej teplote na čas cca 24 hodín.

5.5.2 Oddelenie PDMS od kremíkovej matrice

Pre jednoduché oddelenie vytvrdeného PDMS od kremíkovej matrice je potrebné ošetriť matricu pred samotným aplikovaním nevytvrdeného materiálu na jej povrch.

Kroky experimentu zahŕňali opláchnutie matrice chemikáliou Alconox (Sigma). 75 mg detergentu bolo rozpusteného v 100 ml destilovanej vody. V nasledujúcom kroku bol tento nedopatrením vzniknutým chybnou poznámkou v protokole vždy opláchnutý, čím sa stratil účinok jednoduchého odlupnutia vytvrdeného PDMS od matrice. PDMS sa preto počas odlupovania trhalo a na kremíkovej matrici zostávali jeho reziduá.

Prvotnou myšlienkou dôvodu chyby bolo nedostatočné vytvrdenie PDMS. Preto boli testované rôzne spôsoby vytvrdzovania materiálu zahŕňajúce konštantné teploty, zmeny teplôt počas vytvrdzovania, zahrievanie na horúcej platničke, v peci, prípadne pri pokojovej teplote, i príprava čipov s rôznou hrúbkou vrstvy PDMS. Žiadna z variant nemala vplyv na odlúpenie PDMS od matrice.

Reziduá PDMS na matrici boli čistené v roztoku „piranha“, zmesi 96% H_2SO_4 (Mercy) a 30% H_2O_2 (Mercy) v pomere 3:1. Exotermická reakcia prebiehajúca po pridaní H_2O_2 do H_2SO_4 po niekoľkých opakovaníach odstránila väčšinu zvyškov PDMS.

Po odhalení chyby bolo vhodné vyrobiť novú kremíkovú matricu a použiť efektívnejší spôsob zabezpečujúci jednoduché odlepenie PDMS.

5.5.3 Oddelenie PDMS od kremíkovej matrice po aplikovaní FAS 17

II. generácia kremíkovej matrice bola pred aplikovaním PDMS ošetrená vrstvou 95% (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl) trimethoxysilanu, nazývaného FAS 17 (ABCR).

Aplikácia FAS 17 prebehla v komore pre „self-assembled“ monovrstvy (SAM) (vyrobené na zakázku). Kremíková matrica bola vložená do určeného priestoru, vedľa bolo uložené mikroskopické sklíčko s $3 \times 10 \mu\text{l}$ kvapkami FAS 17. Po zatvorení víčka bol spustený program nahriatia komory na pracovnú teplotu 150°C s 20 minútovým nástupom nasledovaný postupným chladením. Po vychladnutí komory pod teplotu 60°C bola matrica s monovrstvou FAS 17 vybratá a komora očistená.

FAS 17 modifikoval povrch matrice na superhydrofóbny. Odlupovanie PDMS ďalej nespôsobovalo problémy. Plát PDMS odlúpený z matrice obsahoval

9 mikrofluidických čipov. Tie boli podľa oddeľovacích línií rozrezané skalpelom na jednotlivé kusy.

5.5.4 Uzavretie štruktúr PDMS

Pred trvalým uzavretím štruktúr bolo potrebné zhotoviť otvory v PDMS slúžiace na prechod kvapaliny mikrofluidickými kanálmi. Spolu bolo v každom PDMS vytorených 16 dier, vždy na začiatku a konci každého mikrokanála. K príprave diery bola použitá injekčná ihla s odrezanou špičkou a nabrúseným hrotom s priemerom 1,2 mm.

V budúcnosti by mali byť mikrofluidické čipy platformou sklenených elektrochemických čipov. Preto boli vytvorené PDMS čipy vyrobené k testovaniu spájané so skleneným mikroskopickým sklíčkom.

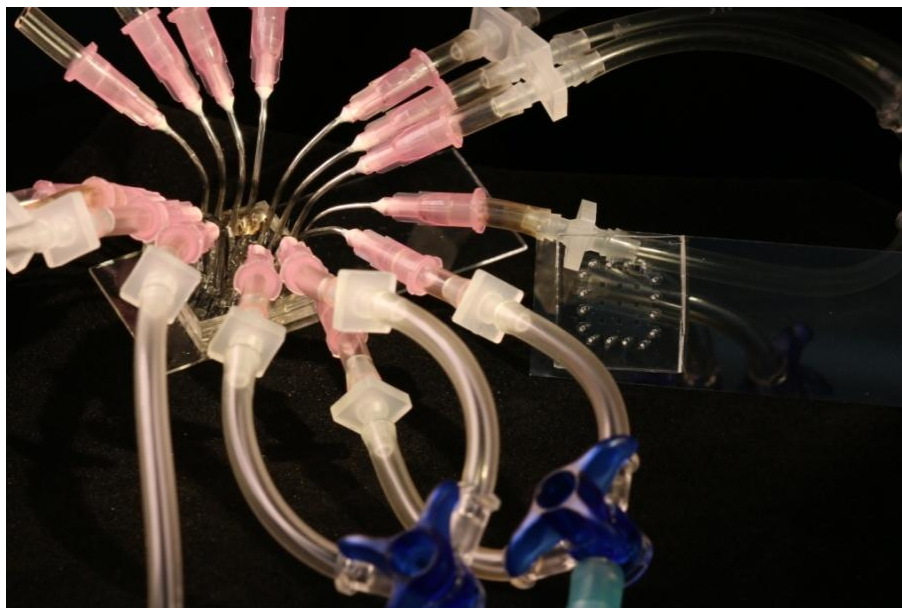
Obidva materiály boli pred spojením očistené etanolom, opláchnuté v destilovanej vode a následne vystavené kyslíkovej plazme v „Diener NANO Plasma cleaner“ pri nastavených parametroch: tlak 0,4 mbar, výkon 50 W, čas 45 s. Ošetrované materiály boli následne opatrne spojené tak, aby nedošlo k zrúteniu alebo deformácii mikrokanálov. Príčinou nespojenia materiálov bola vo väčšine prípadov prítomnosť prachu.

Podľa predpokladu je nevratné spojenie medzi PDMS a sklom spôsobené vznikom kovalentnej väzby (po strate vody Si–O–Si). Poškodenie spojenia by viedlo k poškodeniu samotného PDMS. [63]

5.6 Testovanie PDMS mikrofluidického systému

Mikrofluidický systém na testovanie prúdenia kvapaliny (Obr. 5-10) pozostáva zo samotného mikrofluidického čipu s napojenými injekčnými striekačkami, systémom mikrofluidických trubičiek, konektorov a ventilov na tzv. „syringe“ pumpy.

Do mikrofluidického čipu je pripojených 16 injekčných striekačiek s odrezanými špičkami a priemerom 1,2 mm. Diery v mikrokanáloch boli pred zavedením ihlami pokvapkané izopropanolom z dôvodu jednoduchšieho zavedenia s menšou pravdepodobnosťou natrhnutia materiálu. Následne boli spoje ihlami trvalo utesnené dvojzložkovým lepidlom.



Obr. 5-10 Mikrofluidický systém a samostatný PDMS mikrofluidický čip

Pri testovaní pretekania kvapaliny vybraným kanálom boli ku kontrole toku použité „syringe“ pumpy typu NE-1000 (New Era Pump System, Inc.), na Obr. 5-11 v kombinácii s 10ml injekčnými striekačkami. K dispozícii boli tri takéto pumpy. Pre vizualizáciu usmerňovaného toku kanálom bolo pri prvotnom testovaní použité bežne dostupné potravinárske farbivo, neskôr fluorescenčné farbivo fluoresceín excitované svetlom s vlnovou dĺžkou 366 nm UV lampou Kruss pri obmedzenom prístupe denného svetla.

Cieľom testovania bolo dosiahnutie pretekania kvapaliny vybraným vertikálnym kanálom. Z toho dôvodu bola jedna pumpa použitá na tlačenie kvapaliny na začiatku otvoreného vertikálneho kanálu. Zvyšné tri vertikálne kanály boli na začiatku i na konci uzavreté stop konektormi.



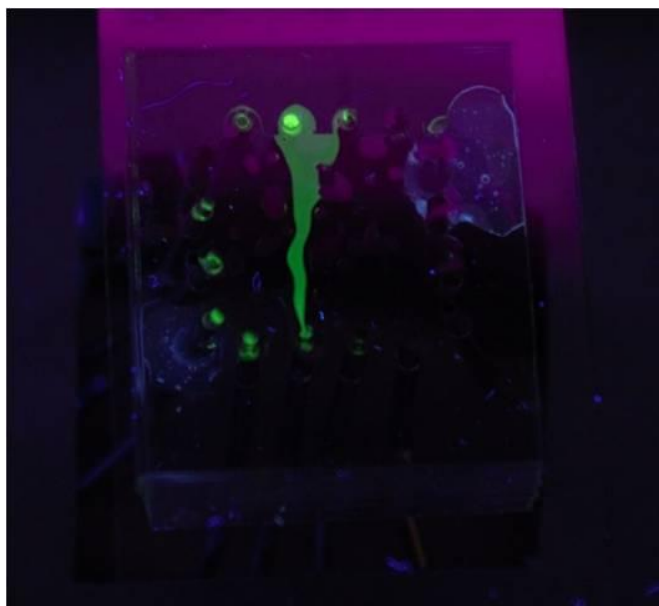
Obr. 5-11 „Syringe“ pumpa typu NE-1000 (New Era Pump System, Inc.) použitá k testovaniu PDMS mikrofluidického systému

Na tlačenie prúdu vody zo strán boli k dispozícii 2 zvislé pumpy. Každá pumpa bola pomocou mikrofluidických trubičiek a troch ventilov pripojená na štvoricu vertikálnych kanálov. Ventily umožňovali otvorenie žiadneho, jedného alebo oboch prúdov. Takto mohla byť voda tlačaná ktorýmkoľvek z 8 horizontálnych otvorov.

Prúd kvapaliny tlačenej „syringe“ pumpou bol kontrolovaný nastavením objemového prietoku. Funkčnosť mikrofluidického systému bola overená s objemovým prietokom vertikálnych kanálov nastavených na hodnotu $15 \text{ ml} \cdot \text{hodina}^{-1}$

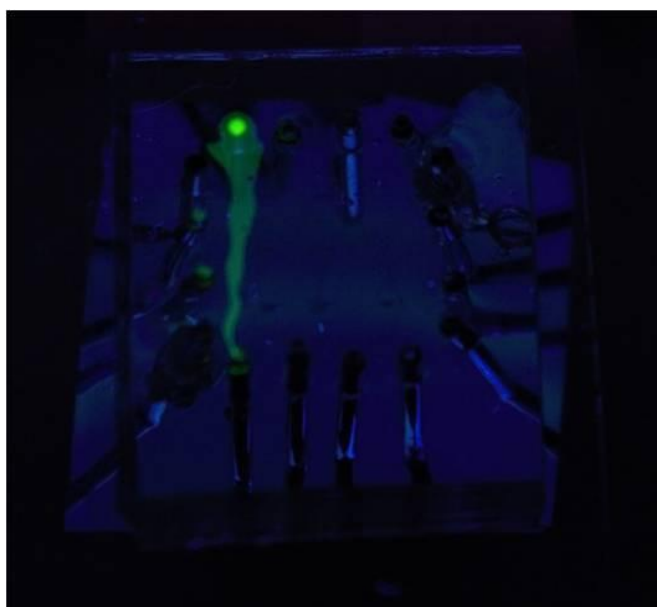
Objemový prietok horizontálnych otvorov i výber použitia konkrétnych otvorov bol určený experimentálne. Z dôvodu snahy o lepšie zobrazenie prúdu tečúceho vybranými kanálmi prebehli experimenty s čipom otočeným napojenými ihlami nadol.

Pri pretekaní fluoresceínu druhým kanálom zľava, zobrazeným na Obr. 5-12, bol na ľavej strane čipu otvorený prvý kanál zhora s nastaveným objemovým prietokom $45 \text{ ml} \cdot \text{hodina}^{-1}$. Na pravej strane čipu boli otvorené prvé dva kanály zhora. Objemový prietok bol nastavený na $180 \text{ ml} \cdot \text{hodina}^{-1}$. Nastavenie 4-krát väčšieho objemového prietoku kvapaliny bolo potrebné zo spomínaného dôvodu – jedna pumpa tlačila kvapalinu do dvoch otvorov kanálov, ktoré boli zároveň vzdialenejšie od usmerňovaného vertikálneho kanála v porovnaní s otvorom na ľavej strane čipu.



Obr. 5-12 Pretekánie fluoresceínu vybraným druhým vertikálnym kanálom zľava

Obr. 5-13 zobrazuje pretekánie fluoresceínu prvým vertikálnym kanálom zľava. Na ľavej strane čipu bol otvorený prvý kanál zhora s nastaveným objemovým prietokom $20 \text{ ml} \cdot \text{hodina}^{-1}$. Na pravej strane čipu boli otvorené prvé dva kanály zhora. Objemový prietok bol nastavený na $190 \text{ ml} \cdot \text{hodina}^{-1}$.



Obr. 5-13 Pretekánie fluoresceínu vybraným krajným kanálom zľava

5.7 Diskusia

Prvou voľbou materiálu pre výrobu mikrofluidického čipu bol PDMS, ktorý je využívaný pri väčšine prieskumu v oblasti mikrofluidiky.

Napriek mnohým benefitom má PDMS limitácie pri použití v biomedicínskom výskume a nie je tak univerzálnym materiálom pre mikrofluidiku. Z PDMS do média pretekajú z mikrokanálov uvoľňované nevytvrdené oligoméry a zároveň PDMS absorbuje malé hydrofóbne molekuly z média. Permeabilita materiálu predstavuje problém s odparovaním vzorky pri použití malých objemov. [40; 61; 70]

Problematickými krokmi pri výrobe PDMS čipu bolo najmä:

- odhadnutie rýchlosti leptania v reálnych podmienkach,
- spojenie PDMS kanálov so sklom po ošetrovaní plazmou bez zrušenia alebo deformovania kanálov,
- vytvorenie otvorov na začiatku a konci kanálov bez pretrhnutia materiálu,
- časovo náročné nastavovanie vhodných objemových prietokov kvapalín prúdiacich mikrofluidickými kanálmi.

Výroba mikrofluidického čipu je relatívne jednoduchá, finančne nenáročná a zároveň nevyžaduje čisté priestory. Pri výrobe väčšieho množstva čipov by ale kvôli vyššie spomenutým dôvodom bolo vhodné uvažovať nad voľbou iného materiálu a metódy výroby.

6 PMMA MIKROFLUIDICKÝ SYSTÉM

Z dôvodu dostupnosti CNC strojov bol po PDMS materiálom na výrobu mikrofluidického systému opäť polymér, často používaný a ľahko dostupný PMMA.

Výroba mikrofluidického systému obsahovala oproti predchádzajúcej metóde menej úkonov:

- dizajn mikrokanálov,
- príprava čipu s použitím CNC obrábacieho nástroja,
- uzavretie kanálov spojením čipu s podkladovým materiálom,
- napojenie čipu na systém trubičiek a pump nasledované testovaním systému.

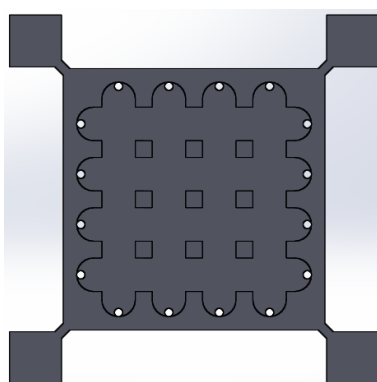
6.1 Charakteristika PMMA

K výhodným vlastnostiam PMMA patrí:

- vysoká chemická a mechanická stabilita,
- excelentná optická transparentnosť,
- možnosť jednoduchšej výroby priamymi metódami,
- biokompatibilita,
- nízka cena čipu,. [71]

6.2 Dizajn a výroba PMMA mikrofluidického čipu

K príprave mikrofluidických kanálov z PMMA bol ponechaný dizajn kanálov PDMS. Tvar celkového čipu bol upravený pre jednoduchšiu manipuláciu (Obr. 6-1).



Obr. 6-1 Dizajn PMMA mikrofluidického čipu v 3D dizajnovom software SolidWorks

Z dôvodu výroby pomocou CNC obrábacieho nástroja bolo potrebné zhotoviť 3D dizajn mikrofluidického čipu v 3D dizajnovom software SolidWorks. V programe NX Unigraphics (Siemens, Nemecko) modifikovanom JDPaint (Jingdiao, Čína) boli následne zvolené nástroje a parametre rezania. Na prípravu kanálov bol zadán nástroj fréza s priemerom 2 mm, čo zodpovedá šírke mikrofluidického kanála. Rýchlosť otáčania frézy 20 000 rpm a rýchlosť pohybu 1000 mm·min⁻¹. K vytvoreniu dier a orezaniu celého čipu bol navrhnutý vrták s priemerom 0,5 mm, rýchlosťou otáčania 2000 rpm a rýchlosťou pohybu 1000 mm·min⁻¹. Informácie o pohybe nástrojov boli transformované do G-kódu, programovacieho jazyka, ktorý riadi CNC obrábacie nástroje.

Navrhnutá výška mikrofluidického čipu bola 2 mm. Do CNC obrábacieho nástroja Obr. 6-2 bol preto vložený a uchytený 2mm PMMA plát. Procesu zhotovenia čipu predchádzalo poloautomatické nastavenie z-osi polohy vrtáka a frézy.



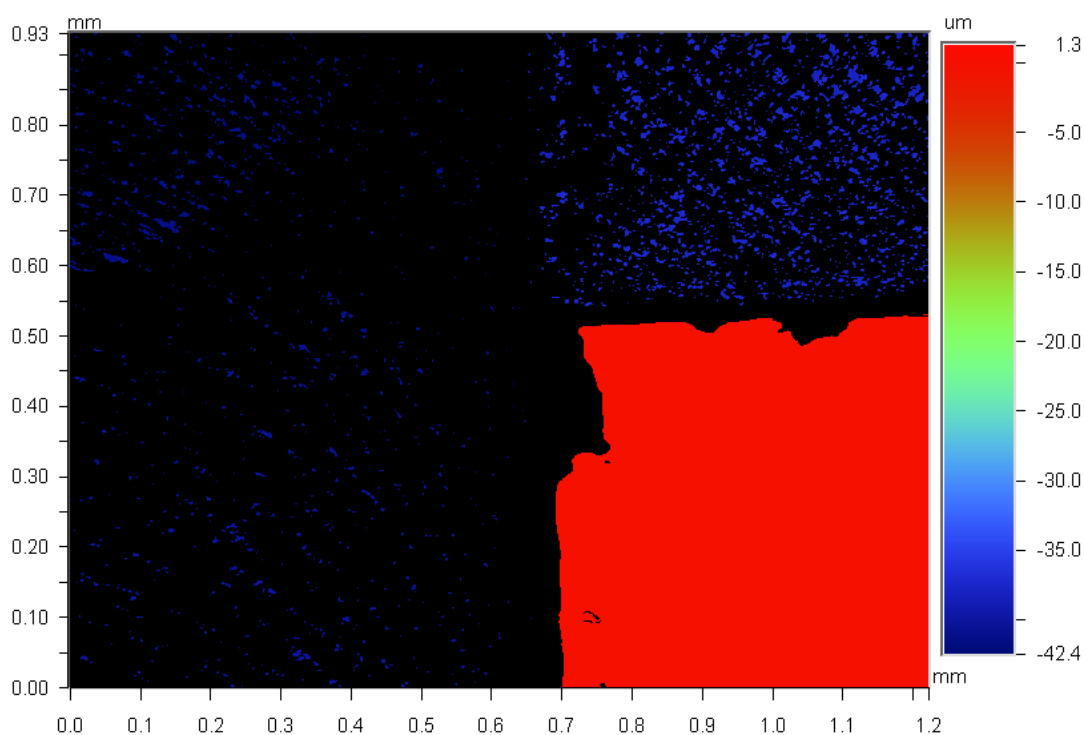
Obr. 6-2 CNC obrábací nástroj pre výrobu PMMA mikrofluidického čipu (JDHGT400 A10H, Jingdiao)

Samotná výroba čipov prebiehala podľa informácií v G-kóde automaticky. Obrábanie materiálu do hĺbky, t.j. vytvorenie dier a orezanie čipu, prebiehalo v dvoch krokoch, vždy maximálne do hĺbky 1 mm, v prípade orezania čipu s plynulým nábehom nástroja do materiálu, aby nedošlo k zničeniu obrábacieho nástroja. Týmto spôsobom bolo vytvorených 10 mikrofluidických čipov.

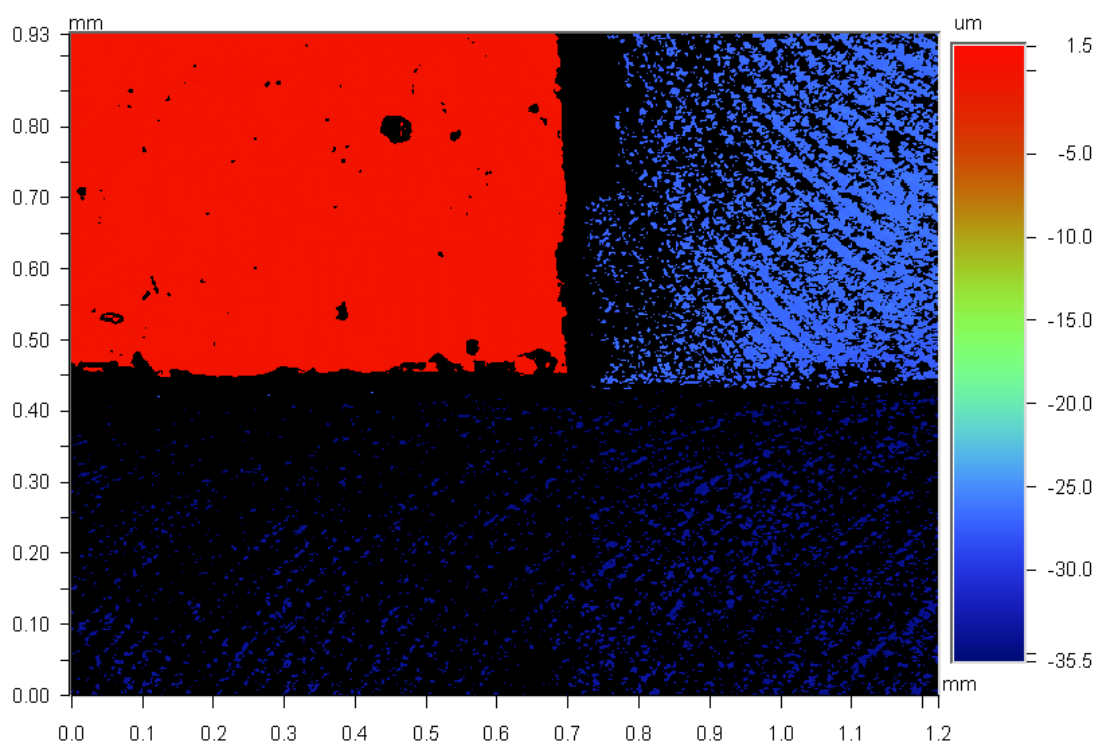
6.2.1 Kontrola parametrov vyrobeného čipu

Parametre vyrobených mikrofluidických čipov boli overené na optickom profilometri Veeco NT1100 (Veeco Instruments), v režime vertikálnej skenovacej interferometrie. Podľa informácií v datasheete priloženom na pracovisku je režim vhodný pre merania s krokom v osi y väčším ako 160 nm a vertikálnym rozlíšením 5 nm.

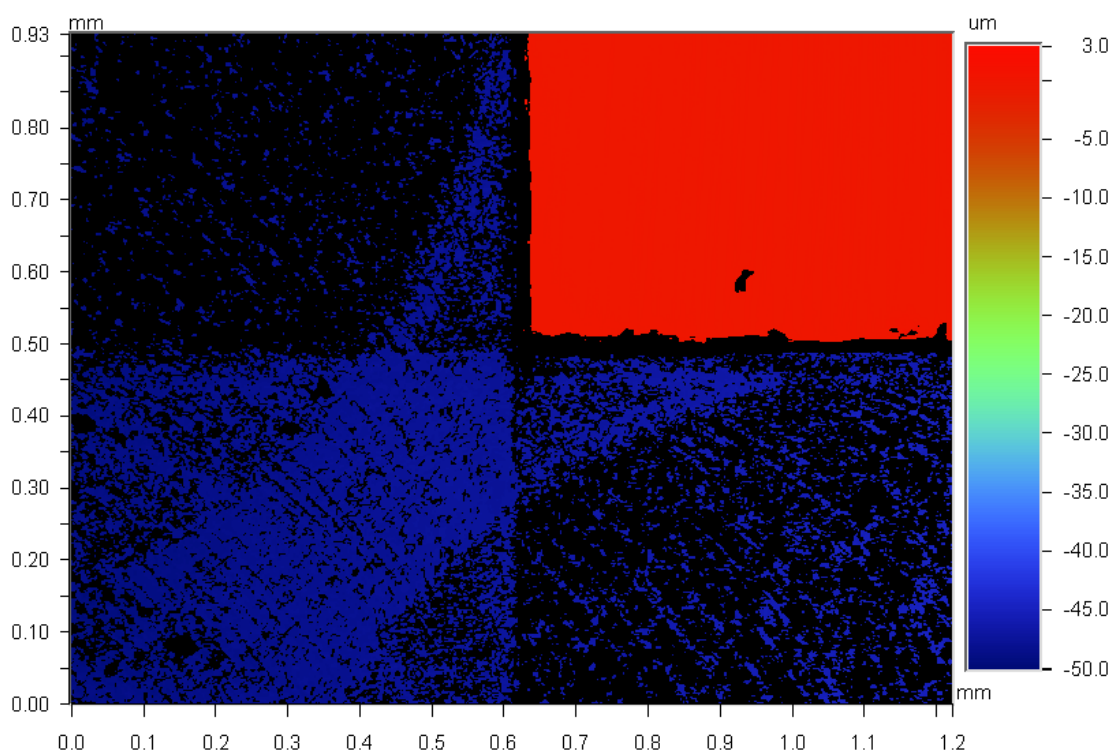
Profilometrom boli overené parametre 4 mikrofluidických čipov, pre každý čip na dvoch miestach v smere osi x aj y . Pozorovaný bol povrch vyfrézovaných kanálov vzhľadom ku tzv. ostrovčekom, t.j. miestam na čipe, ktoré boli neskôr spojené so sklom z dôvodu uzavretia kanálov. Meranými parametrami boli hĺbka a drsnosť povrchu kanálov hodnotená pomocou RMS, rovnako ako u matrice pre výrobu PDMS. Na Obr. 6-3 až Obr. 6-6 sú zobrazené snímky povrchov jednotlivých čipov. Tabuľka na Obr. 6-7 obsahuje hodnoty nameraných hĺbok a RMS kanálov.



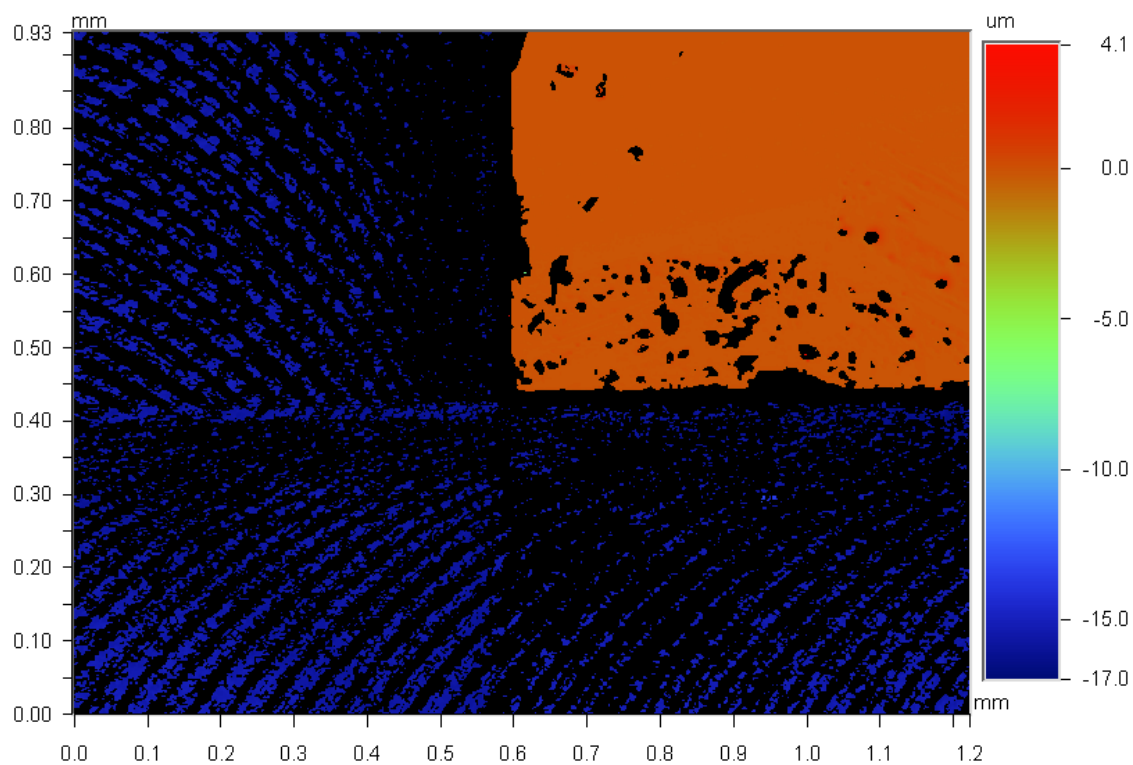
Obr. 6-3 Povrch mikrofluidického čipu č. 1, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček



Obr. 6-4 Povrch mikrofluidického čipu č. 2, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček



Obr. 6-5 Povrch mikrofluidického čipu č. 3, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček



Obr. 6-6 Povrch mikrofluidického čipu č. 4, zobrazenie rozhrania kanál a tzv. ostrovček

číslo čipu	smer v ose x		smer v ose y	
	výška	RMS	výška	RMS
1	57.69	23.18	57.15	3.04
	40.74	9.08	37.97	10.64
2	44.38	7.99	44.69	14.51
	27.49	9.56	34.71	8.59
3	71.43	15.96	68.71	25.37
	48.14	17.24	46.44	19.82
4	16.56	6.02	15.94	3.68
	10.35	3.76	10.46	3.8

Obr. 6-7 Tabuľka nameraných hodnôt výšky mikrofluidického kanála v smere osi x a y s príslušnými hodnotami RMS, pre každý čip na dvoch miestach

Vzhľadom na získané informácie o povrchu kanálov je možné konštatovať, že zvolená výroba mikrofluidických čipov z PMMA nie je ideálna, čo spôsobilo pravdepodobne viac faktorov.

Použitý CNC obrábací nástroj nie je dizajnovaný pre výrobu mikroštruktúr a nedokáže ich vyrobiť s dostatočnou presnosťou. Rozlíšenie v osiach x , y a z je 20 μm . Na Obr. 6-3 až Obr. 6-6 sú na povrchu kanálov badateľné ryhy od nástroja na frézovanie. Najmä na Obr. 6-5 je tiež viditeľný rozdiel medzi hĺbkou horizontálneho a vertikálneho kanála.

Ďalším faktorom, ktorý je potrebné zohľadniť pri výrobe mikroštruktúr, je kvalita PMMA plátu. Použitý plát mal hrúbku 2 mm s toleranciou $\pm 0,1$ mm. Aby nedošlo k poškodeniu CNC obrábacieho nástroja, PMMA bolo podložené ďalším 4mm plátom PMMA. Tieto skutočnosti mali vplyv na obrábanú rovinu PMMA, ktorá tak nemala požadovanú hrúbku a pravdepodobne tiež nebola vodorovná, prípadne nebola vodorovná lokálne. Riešením nedostatkov by mohlo byť použitie vysokokvalitného PMMA a CNC mikroobrábacieho nástroja.

Hĺbka mikrofluidických kanálov zvyšných čipov bola prekontrolovaná digitálnym mikroskopom KH-7700 (Hirox). Systém určuje hĺbku odčítaním polohy najnižšie a najvyššie zaostreného miesta na vzorke. Žiadny z čipov nemal menší rozdiel hĺbok na rozdielnych miestach čipu alebo nižšiu hodnotu RMS ako čip číslo 4.

Napriek spomenutým nedostatkom bol čip číslo 4 ďalej použitý k testovaniu.

6.2.2 Uzavretie štruktúr PMMA

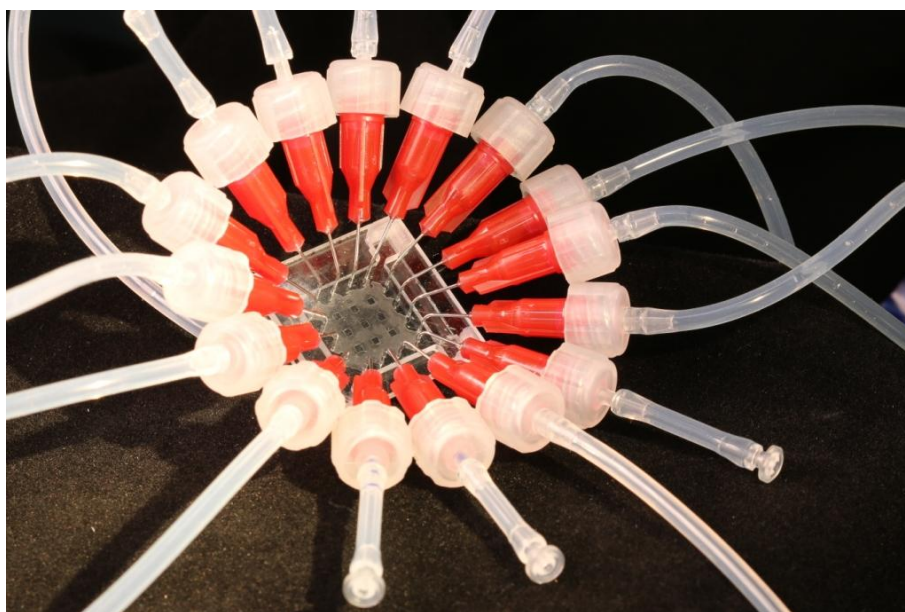
PMMA čip bol podobne ako PDMS čipy spojený so skleneným mikroskopickým sklíčkom. Obidva materiály boli pred spojením očistené, PMMA v destilovanej vode za využitia ultrazvukovej čističky, sklo etanolom a destilovanou vodou a následne ofúkané dusíkom.

K spojeniu PMMA čipu a skla bolo zvolené použitie adhezív. Ako najvhodnejší typ sa javili UV adhezíva. Ich vytvrdenie je spôsobené fotochemickou reakciou iniciovanou UV svetlom, čo poskytovalo dostatok času pre aplikovanie lepidla na čip.

Prvé testované vzorky boli spojené transparentným UV lepidlom Kafuter K-303 (Guangdong Hengda New Materials Technology). Nevýhodou lepidla bola nízka viskozita, ktorá spôsobovala zatekanie lepidla do kanálov. Druhou voľbou bolo komerčné transparentné gélové lepidlo (nedohľadateľný výrobca), ktoré sa javilo ako vhodné. Na vytvrdenie oboch typov lepidiel bolo použité UV svetlo (vyrobené na zakázku) s vlnovou dĺžkou 395 nm a výkonom 40 W.

6.3 Testovanie PMMA mikrofluidického systému

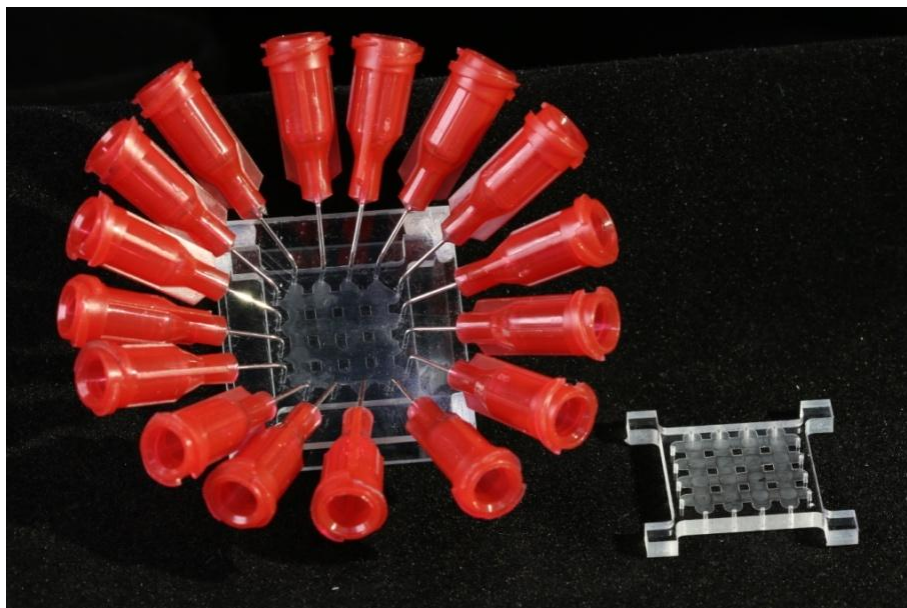
Mikrofluidický systém na Obr. 6-8 pozostáva, rovnako ako predchádzajúci systém, z PMMA čipu, ihl, systému mikrofluidických trubičiek, rôznych konektorov a ventilov, „syringe“ pump.



Obr. 6-8 Mikrofluidický systém s PMMA čipom

Po skúsenosti práce so systémom s PDMS čipom, boli prvky nového systému čiastočne obmenené a miniaturizované. K mikrofluidickému čipu bolo pripojených 16 ihl s tupými špičkami, vnútorným priemerom 0,26 mm, vonkajším priemerom 0,51 mm a 60° sklonom ihly. Súčasťou systému bol transparentný držiak ihl viditeľný na Obr. 6-9. Spoj ihl a PMMA čipu bol dostatočne tesný a nebolo potrebné ho tesniť lepidlom. Silikónové trubičky mali vnútorný priemer 1 mm a vonkajší priemer 3 mm.

Tok kvapaliny mikrofluidickým systémom bol kontrolovaný „syringe“ pumpami TYD01 (Lead Fluid) s použitím 3ml injekčných striekačiek. Pre vizualizáciu toku kvapaliny bol použitý roztok metylénovej modrej.

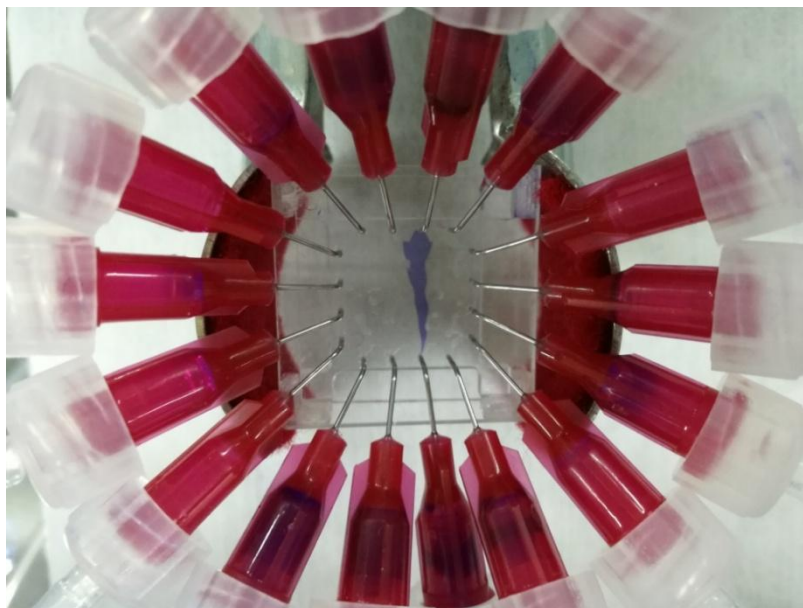


Obr. 6-9 PMMA čip s držiakom ihl napojený na ihly a samostatný PMMA čip

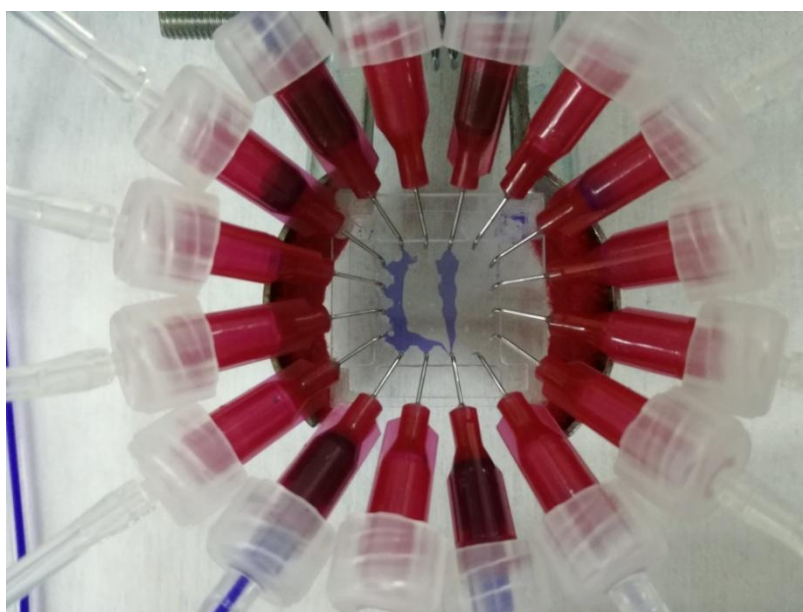
Prvý test mikroufluidického systému spočíval v zopakovaní rovnakého experimentu ako s použitím PDMS čipu. Tri vertikálne kanály boli opäť uzavreté a sústava trubičiek a ventilov umožňovala tlačenie vody ktorýmkoľvek zo 4 bočných kanálov na každej strane. Objemové prietoky bolo potrebné oproti predchádzajúcemu systému upraviť.

Pretekanie metylenovej modrej tretím vertikálnym kanálom zľava je zobrazené na Obr. 6-10. Objemový prietok smerujúci do vertikálneho kanála bol nastavený na hodnotu $45 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Na pravej strane čipu bol otvorený prvý a tretí kanál zhora s objemovým prietokom nastaveným na $190 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ a na ľavej strane prvý a druhý kanál s nastavenými $100 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Pretekanie rovnakým vertikálnym kanálom mohlo byť nastavené rôznymi inými konfiguráciami otvorenia a zatvorenia kanálov, či prietokov, napr. otvorené kanály zhora vľavo prvý, vpravo prvý a druhý, s prietokovými objemami nastavenými vľavo na 95, vpravo na $65 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Ďalší experiment prebiehal s použitím štyroch „syringe“ púmp. Všetky kanály v horizontálnom smere boli zatvorené a všetky kanály vo vertikálnom smere otvorené. Žiadna z kombinácií nastavení prietokových objemov neviedla k získaniu požadovaného výsledku, kedy by roztok metylenovej modrej prechádzal prvým a tretím vertikálnym kanálom zľava. Prietok kvapaliny v prvej tretine čipu bol kontrolovaný, ale pri vystupovaní z čipu kvapalina z prvého a druhého kanála zľava prechádzala treťou ihlou tak, ako je vidieť na Obr. 6-11. Snímka vznikla pri nastavení prietokových objemov na 20, 50, 20 a $30 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ v poradí na čipe zľava.



Obr. 6-10 Pretekánie metylénovej modrej vybraným druhým vertikálnym kanálom zľava



Obr. 6-11 Pretekánie metylénovej modrej vybranými kanálmi jedna a tri zľava

6.4 Diskusia

Po úspešnej príprave prototypu mikrofluidického systému z PDMS, zohľadnení výhod a nevýhod použitia PDMS a získaniu prístupu k CNC obrábaciemu nástroju, bola snaha vytvoriť mikrofluidický čip z materiálu PMMA.

Pri kontrole parametrov vyrobených mikrofluidických čipov bolo zistené, že požadované štruktúry s hĺbkou 20µm nie je možné vytvoriť s dostatočnou presnosťou a že povrch štruktúr je značne drsný. Napriek tomu bol čip s najlepšimi parametrami testovaný.

K spojeniu mikrofluidického čipu so sklom bolo použité UV lepidlo, ktorého výrobca nebol dohľadateľný a preto nebol k dispozícii ani jeho datasheet. V budúcnosti, kedy by čip mal byť súčasťou systému na detekciu biomarkerov, by bolo vhodné nahradiť ho kvalitnejším. Vhodnou variantou by mohlo byť napr. UV lepidlo s vysokou hodnotou viskozity EPO-TEK[®] OG116-31 (Epoxy Technology). Lepidlo spĺňa podmienky VI. triedy USP (United States Pharmacopeia), ktoré sa týkajú štandardov pre záruku medicínskych a iných zdravotníckych technológií. Ďalšou možnosťou je úplné nahradenie uzavretia kanálov adhezívami.

Z hľadiska použitia pre detekciu vzoriek biomarkerov sa môže aktuálny dizajn javiť ako diskutabilný. Mikrofluidický čip obsahuje sekcie, v ktorých sa krížia vertikálne a horizontálne kanály. Navyše, mikrofluidický systém vyžaduje určitú dobu potrebnú na ustálenie prúdenia kvapalín. Pri reálnych vzorkách by za týchto podmienok mohlo dochádzať ku kontaminácii roztokov.

Pri testovaní mikrofluidického systému z PDMS aj PMMA ale nebola dodržaná základná podmienka, kvôli ktorej boli systémy vytvárané. Kvapalina mala byť usmerňovaná tak, aby pretekala cez povrch všetkých elektrochemických buniek. Na Obr. 5-12, Obr. 5-13 a Obr. 6-10 je viditeľné, že sa tok kvapaliny pretekajúcej vybraným kanálom smerom k výstupu z kanála zužuje. Tento by po spojení s elektrochemickým čipom spôsobil, že cez niektoré elektrochemické bunky by pretekala iba voda usmerňujúca tok vybraného vertikálneho kanála, nie analyt.

6.5 Nový dizajn a výroba mikrofluidických systémov

Metodika detekcie biomarkerov, podľa ktorej budú jednotlivé vertikálne kanály funkcionalizované „cross-linkermi“ a stĺpcami budú následne pretekať vzorky s rôznymi biomarkermi, bola testovaním vyrobených systémov z PDMS a PMMA spočívajúcich. Preto bol dizajn mikrofluidických čipov prerobený (Obr. 6-13 až Obr. 6-15) a podľa neho boli vyrobené nové PMMA čipy. Testovaná bola tiež cenovo nenáročná, metóda uzavretia mikrofluidických štruktúr s použitím polyimidového filmu Kapton (Goldfinger). [72; 73]

Prvým krokom výroby bola príprava PMMA dielu s rozmermi výsledného požadovaného čipu a dierami pre prívod a odvádzanie kvapaliny. Výroba prebiehala opäť na CNC obrábacom nástroji s použitím vrtáka s rýchlosťou otáčania 2000 rpm a rýchlosťou pohybu $1000 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. V prípade prípravy systému s jednosmerovo orientovanými kanálmi (Obr. 6-13) boli vyrobené diery s priemerom 0,5 mm, pre systémy „komôrok“ (Obr. 6-14 a Obr. 6-15) s priemerom 0,4 mm.

Mikrofluidické štruktúry boli vytvorené spojením PMMA dielu so sklom pomocou Kaptonu, ktorý mal výšku $50 \text{ }\mu\text{m}$ a boli v ňom vyrezané požadované tvary štruktúr. Automatický rezač kontúr HWQ (Shenzhen Totenw Technology) používa na posun noža krokový motor. Preto bolo potrebné prerobiť guľaté mikrofluidické štruktúry na vektorizované tvary. K tomu bol použitý platformovo nezávislý Nanolitography Toolbox pre skriptované nákresy (NIST) s potrebnou funkciou „shapeReso“ (Obr. 6-12). Pre rezanie štruktúr mal nôž nastavené parametre: rýchlosť pohybu $100 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ a sila prítlaču na Kapton 150 g. [74]

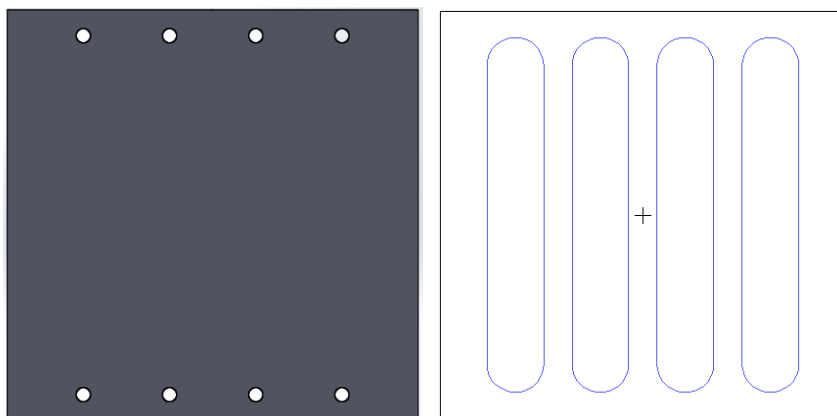
```
10 gdsReso
100 shapeReso
6 layer

<basic struct>
-0 5250 1000 1000 0 180 20 0 arc
0 0 2000 10500 0 rectangleC
-0 -5250 1000 1000 180 0 20 0 arc

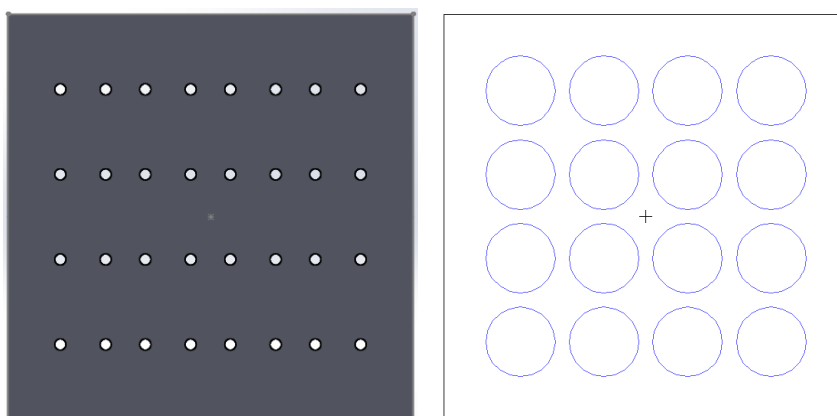
<top struct>
<basic -4500 0 4 1 3000 10000 1 arrayRect>

1 layer
0 0 14300 14300 0 rectangleC
```

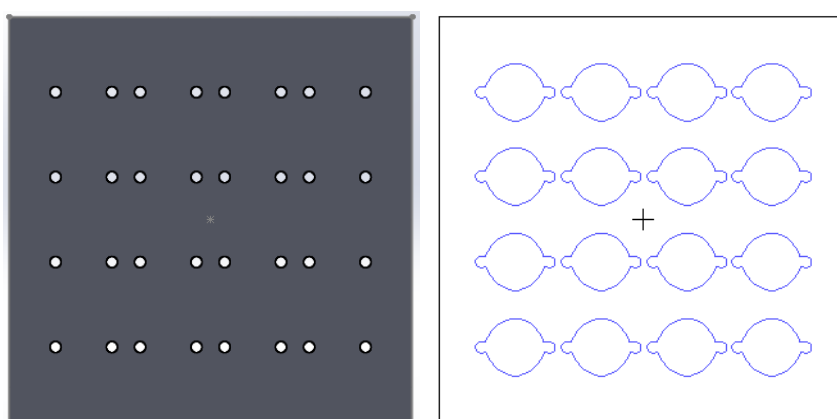
Obr. 6-12 Ukážka zdrojového kódu pre vytvorenie jednosmerovo orientovaných mikrofluidických kanálov pomocou voľne dostupného editoru zdrojových kódov Notepad++ a Nanolitography Toolbox v jazyku CNST scripting



Obr. 6-13 Vľavo: PMMA diel s 0.5mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe jednosmerovo orientovaných kanálov



Obr. 6-14 Vľavo: PMMA diel s 0.4mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe veľkých „komôrok“



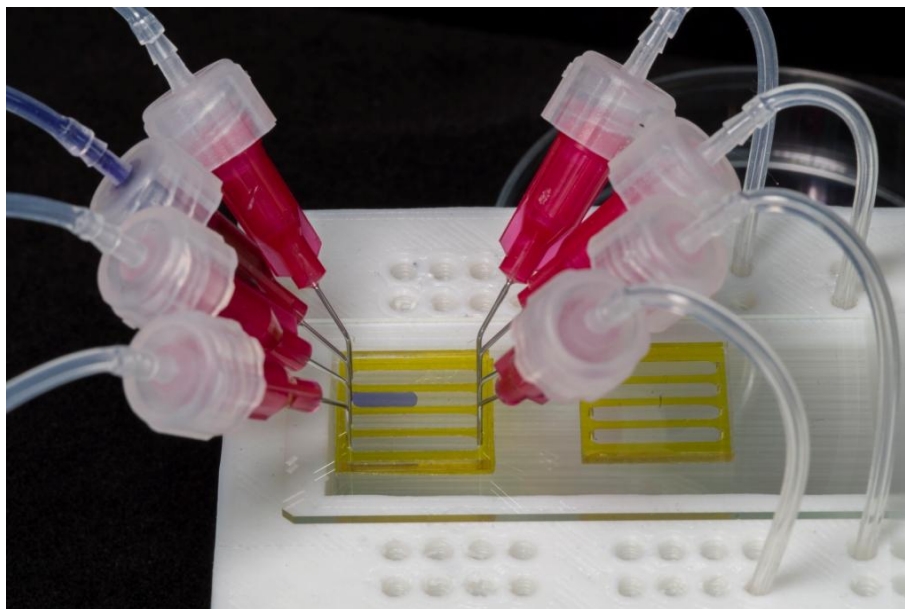
Obr. 6-15 Vľavo: PMMA diel s 0.4mm vnútorným priemerom dier, vpravo: predloha pre rezanie kontúr v Kaptone k výrobe malých „komôrok“

6.6 Testovanie PMMA mikrofluidických systémov

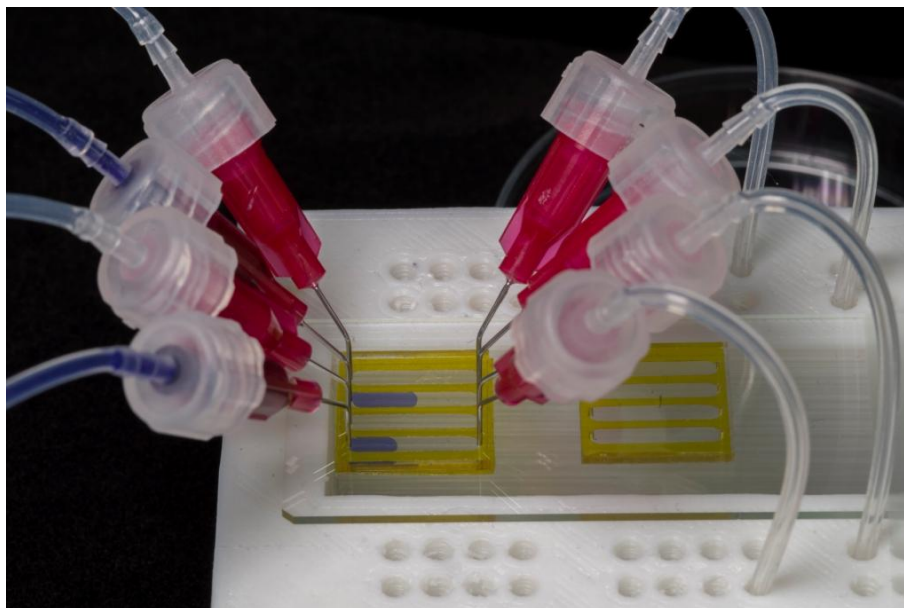
Mikrofluidický systém na Obr. 6-16 a Obr. 6-17 pozostáva z PMMA dielu, Kaptonom spojeného so sklom, ihli a silikónových trubičiek pripojených k 4 „syringe“ pumpám. Parametre použitých častí systému sú zhodné s časťami použitými v prvom PMMA mikrofluidickom systéme (Podkapitola 6.3). Objemový prietok kanálov bol nastavený na hodnotu $10 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Súčasťou systému bol stojan vyrobený na mieru podľa nákresu v dizajnovom prostredí SolidWorks a vyrobený na 3D tlačiarňi (RepRap Prusa i3). Stojan pridržiaval mikrofluidický systém počas experimentu. Diery po stranách slúžili na prevlečenie mikrofluidických trubičiek z konca mikrofluidických štruktúr ku miskám podloženým pod stojanom, ktoré zbierali použitý roztok.

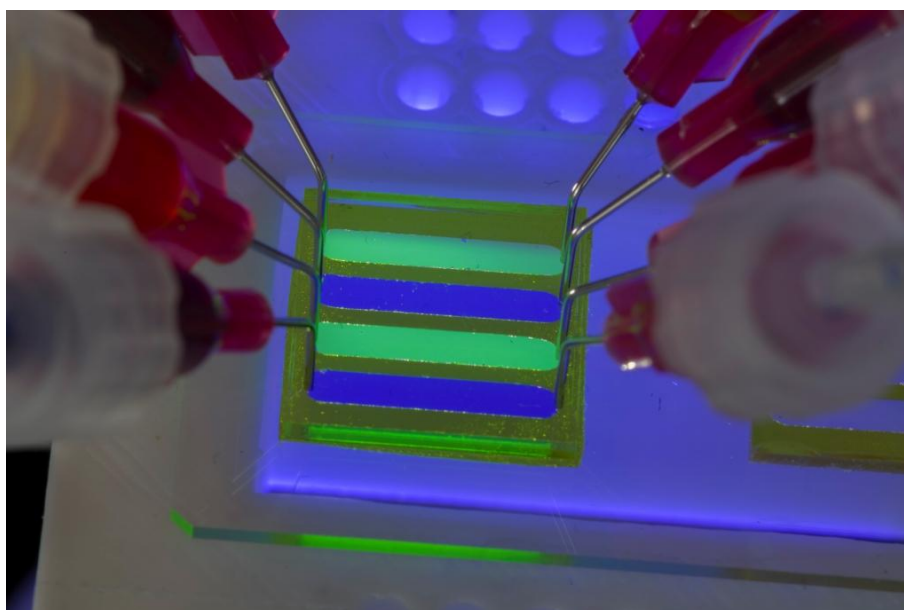
Na Obr. 6-16 až Obr. 6-18 je viditeľné, že systém funguje podľa návrhu. Kvapalina postupne naplňa celý kanál, ktorým preteká. Pre tento typ mikrofluidického systému je potrebné nahradiť pôvodnú predstavu detekcie pomocou vertikálnych i horizontálnych kanálov inou. Naviazanie vhodných „cross-linkerov“ bude musieť byť pravdepodobne uskutočnené pred uzavretím mikrofluidických štruktúr a vedenie kvapaliny v kanáloch bude použité na distribúciu vzoriek obsahujúcich analyty ku elektrochemickým bunkám.



Obr. 6-16 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi s roztokom metylénove modrej pretekajúcej celým vybraným kanálom



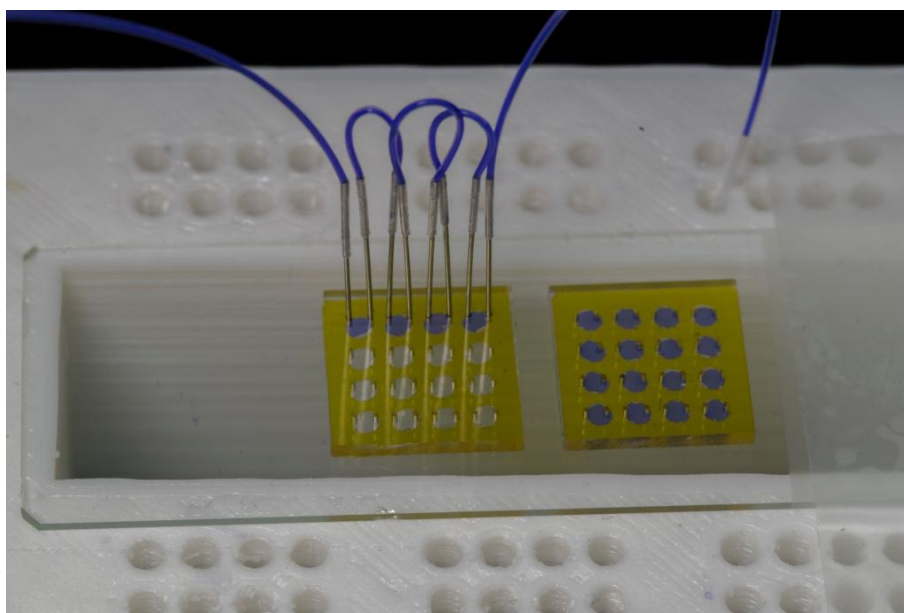
Obr. 6-17 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi s roztokom metylénovej modrej pretekajúcej dvoma vybranými kanálmi



Obr. 6-18 Mikrofluidický systém s jednosmerovo orientovanými kanálmi naplnenými roztokmi metylénovej modrej a fluoresceínu pretekáúcimi celým povrchom kanálov. Systém bol osvietený UV svetlom s vlnovou dĺžkou 395 nm pri výkone 40 W.

Systém „komôrok“ sa od predchádzajúceho systému líši priemerom použitých ihlí bez rezervoára s hodnotami 0,21 mm pre vnútorný a 0,41 mm vonkajší. Pre takto malé rozmery nebola nájdená silikónová trubička a preto bol použitý systém trubičiek z teflonu s vnútorným rozmerom 0,4 mm.

Kvapalina pritekajúca do „komôrky“ bola schopná celú ju zaplniť (Obr. 6-19). Pokiaľ sa spoje medzi ihlami a PMMA v budúcnosti trvalo nezalepia, bude možné presúvať systém ihlí a trubičiek v horizontálnom aj vertikálnom smere a realizovať tak prvotnú myšlienku detekcie analytov.



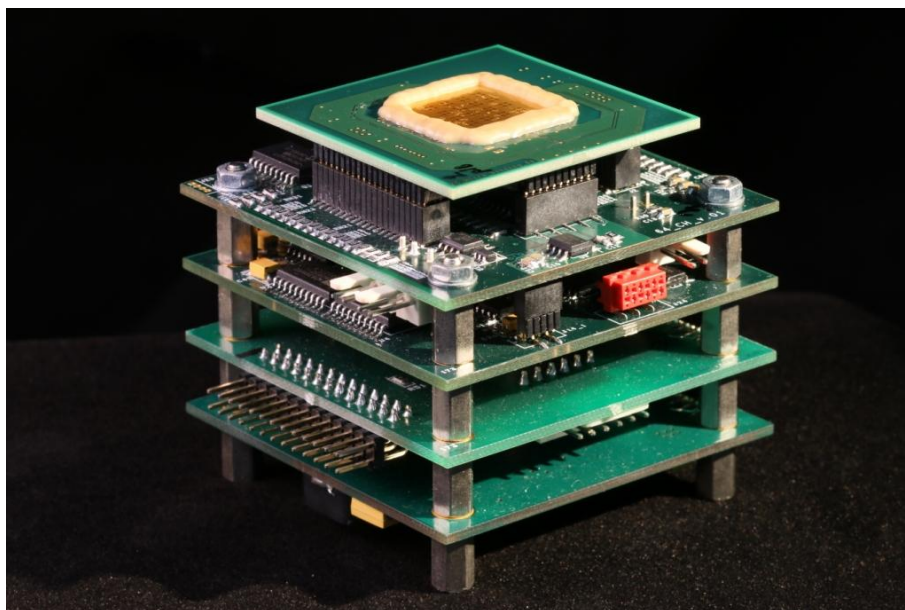
Obr. 6-19 Vľavo: čip s ukážkou časti mikrofluidického systému „komôrok“ ktorými preteká metylénová modrá, vľavo ukážka naplnenia všetkých „komôrok“

6.7 Diskusia

Druhá séria PMMA mikrofluidických čipov má premyslený dizajn. Metóda použitia Kaptonu na účely vytvorenia 50 μm hĺbky kanála a spojenie materiálov sklo – PMMA môže byť tiež považované za úspešné. Testovanie potvrdilo použiteľnosť oboch typov mikrofluidických systémov pre ďalšie analýzy. Detekcia biomarkerov naviazaných na vhodne vybrané „cross-linkery“ by mohla podľa prvotného návrhu fungovať so systémom „komôrok“. Upravený návrh, v ktorom by mikrofluidickými kanálmi prechádzali iba vzorky analytov, by mohol byť použitý so systémom jednosmerovo orientovaných mikrofluidických kanálov.

7 ELEKTROCHEMICKÉ MERANIA

Časť prípravy diplomovej práce prebiehala v rámci výmeny študentov v programe Mechanické inžinierstvo na Northwestern Polytechnical University, Xian, Čína. Tu bol smer práce zameraný na testovanie elektrochemického systému (Obr. 7-1), potrebného k samotným elektrochemickým meraniam.



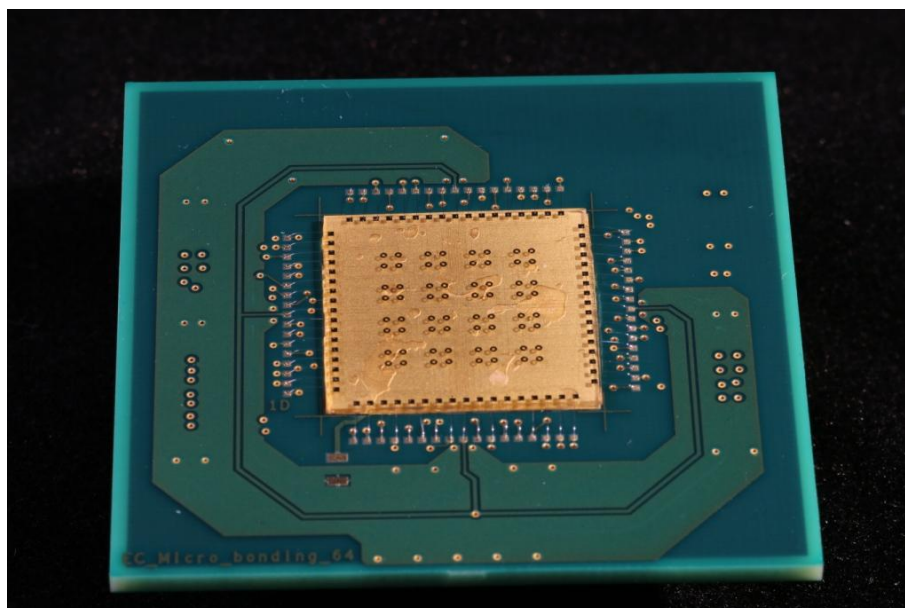
Obr. 7-1 Prenosný „lock-in“ elektrochemický systém

Súčasťou diplomovej práce bolo podieľanie sa na príprave publikácie ohľadom daného systému a jeho základnom testovaní. Dáta boli merané a spracovávané spoluautorami v rôznej miere, v niektorých prípadoch opakovane. Pre získanie komplexného pohľadu na problematiku boli v diplomovej práci použité aj spoločné výsledky.

7.1 Charakteristika „lock-in“ elektrochemického systému

K elektrochemickým meraniam bol používaný prenosný elektrochemický systém na Obr. 7-1, založený na metóde „lock-in“ zosilovača. Súčasťou systému je elektrochemický čip, ktorý pozostáva zo 64 elektrochemických buniek. Tie sú rozdelené na 16 klastrov, kde každý klaster obsahuje 4 elektrochemické bunky (vid' Obr. 7-2).

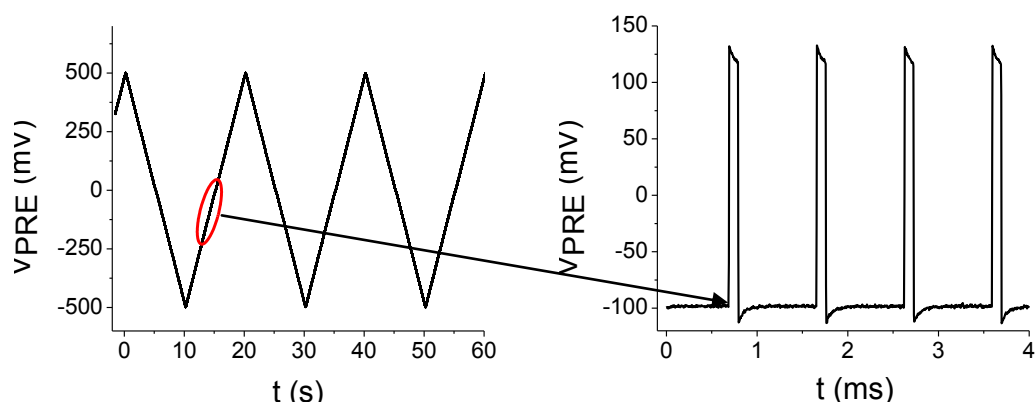
Konfigurácia elektrochemického systému je pripravená tak, aby mohol byť systém skombinovaný s mikrofluidickým čipom na detekciu viacerých biomarkerov z viacerých vzoriek.



Obr. 7-2 Elektrochemický čip tvorený 64 elektrochemickými bunkami rozdelenými do 16 klastrov po 4 elektrochemické bunky

7.2 Princíp fungovania „lock-in“ systému

Každá elektrochemická bunka je tvorená pseudoreferenčnou a pracovnou elektródou. Pseudoreferenčné elektródy sú individuálne napájané pulzmi so štvorcovými vlnami, superponovanými na píllový signál pre cyklickú voltametriu (Obr. 7-3). Pracovné elektródy z jedného klastra sú spojené a uzemnené cez virtuálnu zem operačného zosilovača. Tento konvertuje elektrický prúd pracovných elektród I_{WE} na napätie V_{OUT} . Amplitúda V_{OUT} je následne opäť zosilnená druhým operačným zosilovačom, demultiplexovaná a filtrovaná filtrom s dolnou priepust'ou.



Obr. 7-3 Excitačné symetrické napätie v tvare píly s napätím v rozmedzí ± 500 mV (vľavo) so superponovanými štvorcovými vlnami s amplitúdou ≈ 200 mV (vpravo)

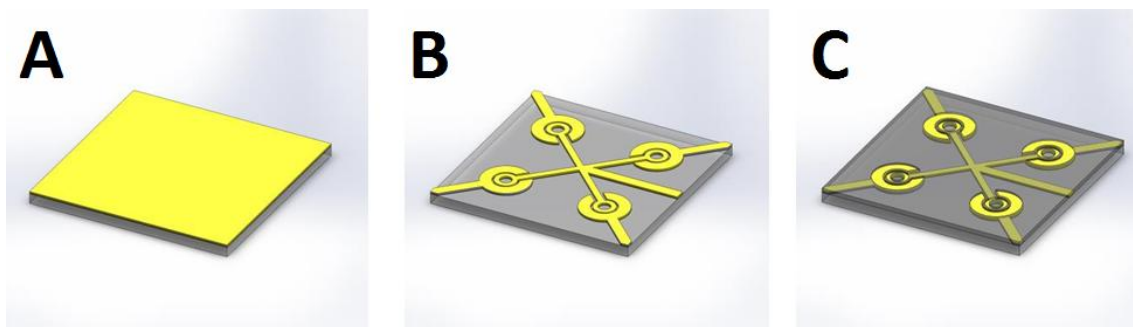
Ku generovaniu pulzov boli použité 4 generátory, pričom každý pracoval na rozdielnej frekvencii. Vďaka tomu mohol byť výsledný signál demultiplexovaný na 4 individuálne signály. Iba signál o danej frekvencii prešiel systémom. To robilo systém vysoko imúnym voči externému šumu. Každý „lock-in“ zosilovač mal navyše pridaných 16 spínačov, čo rozšírilo možnosti merania systému na všetkých 64 elektrochemických bunkách. Elektrochemická metóda s využitím „lock-in“ systému môže byť označená za cyklickú „lock-in“ voltametriu.

Systém je obsluhovaný dvomi počítačovými aplikáciami. Prvá aplikácia umožňuje nastaviť parametre „lock-in“ zosilovača, t.j. 4 pracovné frekvencie. Druhou aplikáciou sa prepína výber 1 zo 16 spínačov. Takto môže užívateľ merať signál zo všetkých senzorov, vždy po bloku – klastri po 4 elektrochemických buniek.

7.3 Výroba elektrochemických čipov

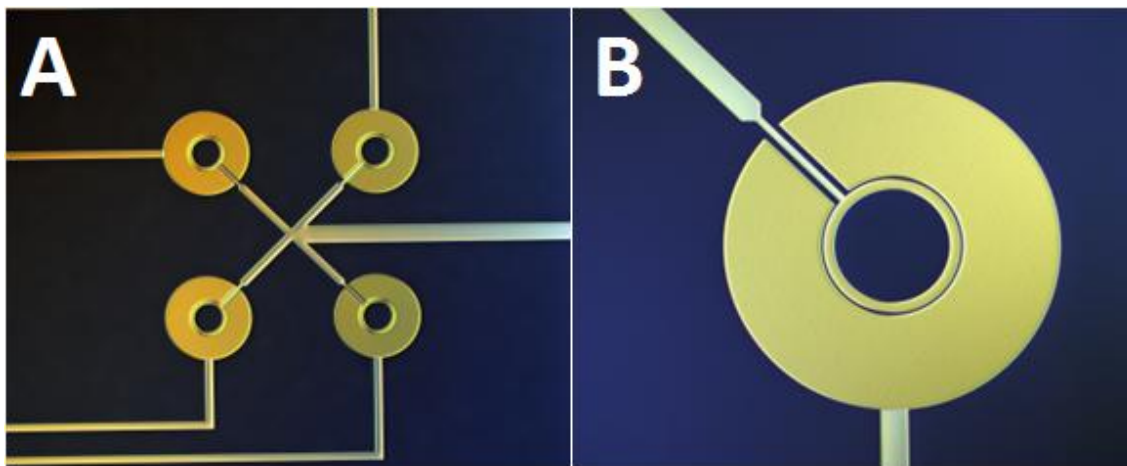
Elektrochemické čipy boli dizajnované použitím pokročilého nástroja na generovanie nákresov [74] a pripravené v National Institute of Standards and Technology (NIST) procesom založenom na planárnej litografii. Sklenené wafere s priemerom ≈ 100 mm boli pokryté tenkou ≈ 20 nm priľnavou vrstvou CrNi. Procesom „physical vapor deposition“ (PVD) bol vytvorený tenký film ≈ 200 nm vrstvy Au (Obr. 7-4, A). Nasledovala litografia s použitím „i-line“ pozitívneho fotorezistu, vývojky hydroxid tetrametylamónny (TMAH) a suché leptanie zlatej vrstvy metódou „ion milling“. Fotorezist bol odstránený kyslíkovou plazmou a čip očistený. (Obr. 7-4, B).

Ďalej boli wafere pokryté vrstvou HMDS kvôli zlepšeniu adhézie povrchu a metódou „plasma-enhanced chemical vapor deposition“ (PECVD) vrstvou SiO_2 (Obr. 7-4, C). Pracovné a pseudoreferenčné elektródy, pady boli odhalené leptaním CHF_3 plazmou. Vrstva SiO_2 bola použitá k ochrane CrNi pred koróziou.



Obr. 7-4 Zjednodušený model procesu prípravy elektrochemických čipov

Výroba elektrochemického čipu viedla k vytvoreniu $\approx 2\mu\text{m}$ medzere medzi pracovnou a pseudoreferenčnou elektródou. Plocha pracovnej elektródy predstavuje $\approx 5969\mu\text{m}^2$ a pseudoreferenčnej elektródy $\approx 162879\mu\text{m}^2$.

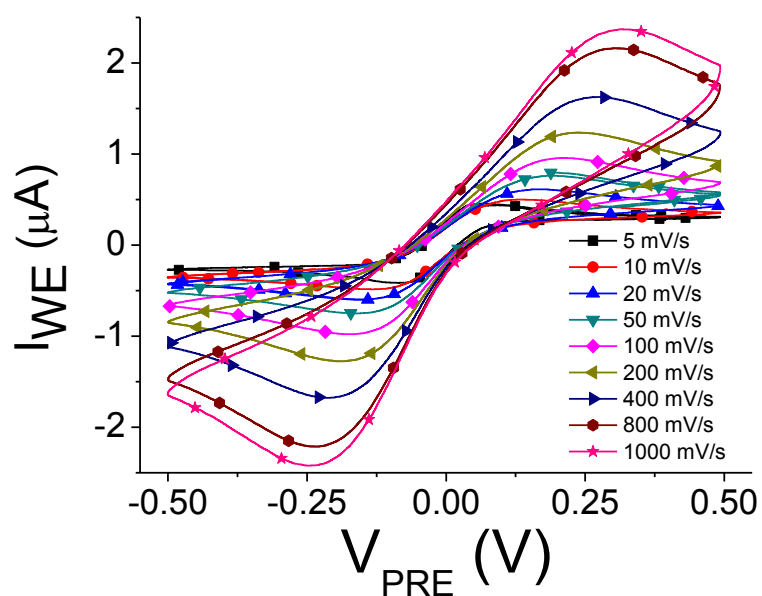


Obr. 7-5 A) Fotografia klastra so 4 elektrochemickými bunkami so spojenými pracovnými a separovanými pseudoreferenčnými elektródami. B) Detail elektrochemickej bunky s povrchom pracovnej elektródy ≈ 27 x väčším ako pseudoreferenčnej elektródy

Wafere s vyrobenými čipmi boli narezané na samostatné čipy s rozmermi $\approx 18 \times 18$ mm diamantovým kotúčom (Kamea service for semiconductor industry, Piešťany). Následne bol z čipov odstránený rezist použitím chemikálie 1-metyl-2-pyrrolidón (NMP stripper). Čipy boli opláchnuté izopropanolom, demineralizovanou vodou a osušené dusíkom. Následne boli rýchloschnúcim lepidlom Loctide prilepené na dosky plošného spoja (PCB) a nabondované hliníkovým drôtom s priemerom $\approx 25\mu\text{m}$. Drôtky boli chránené proti poškodeniu pri manipulácii nanosenou vrstvou tixotropného epoxidu.

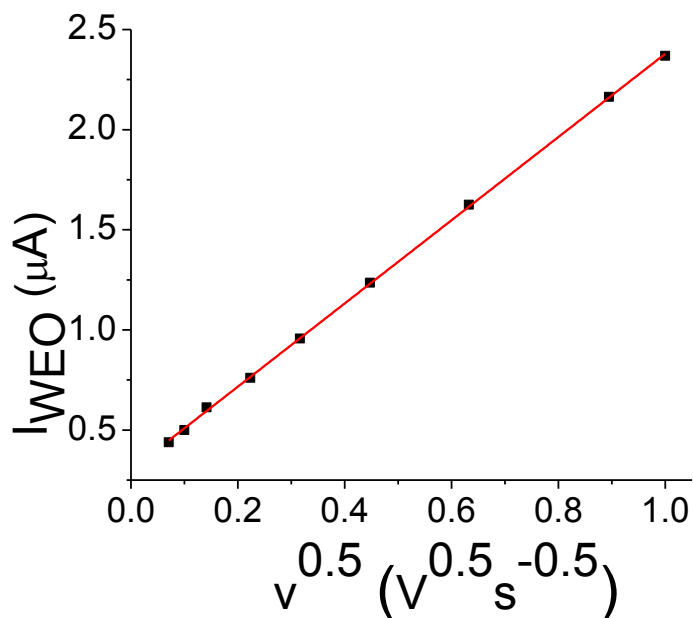
7.4 Testovanie elektrochemického čipu metódou CV

Testovanie elektrochemického čipu metódou cyklickej voltametrie (CV) bolo potrebné pre získanie referenčných dát a experimentálne zistenie elektrochemicky aktívnej plochy pracovnej elektródy. PCB bolo vložené do elektrochemického systému s doskou obsahujúcou konvertor prúdu na napätie. Meranie prebehlo s použitím roztoku $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ a $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ (Sigma Aldrich) s koncentráciou obidvoch zložiek $\approx 2,5\text{ mM}$ v pufovom roztoku $\approx 0,1\text{M KCl}$ ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$). Namerané CV krivky sú na Obr. 7-6.



Obr. 7-6 Krivky z cyklickej voltametre testované v $\approx 2,5$ mM $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku pri rýchlostiach skenovania $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ až $1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ [materiál z publikácie]

Odčítaná hodnota amplitúdy elektrického prúdu (I_{WEO}) bola vykreslená ako funkcia odmocniny skenovacej rýchlosti \sqrt{v} (Obr. 7-7). Lineárna regresia vykazovala takmer dokonalé fitovanie v celom rozmedzí zobrazených CV kriviek, t.j. do $1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, so sklonom $(0.217 \pm 0.001) \mu\text{A} \cdot \text{mV}^{-0.5} \cdot \text{s}^{0.5}$ (priemer a štandardná odchýlka).



Obr. 7-7 Odčítané hodnoty I_{WEO} linerárne proporcionálne \sqrt{v} [materiál z publikácie]

Podľa Randles-Ševčíkovej rovnice tak mohla byť vypočítaná aktívna plocha pracovnej elektródy. Vypočítaná hodnota bola $\approx 6,03\times$ väčšia ako geometrická hodnota. Tento jav bol pravdepodobne spôsobený samotnou výrobou elektrochemických buniek, kedy medzi pracovnou a referenčnou elektródou vznikla malá $2\mu\text{m}$ medzera. Elektródy preto vykazujú čiastočne mikroelektrodové správanie.

7.5 Testovanie elektrochemického systému

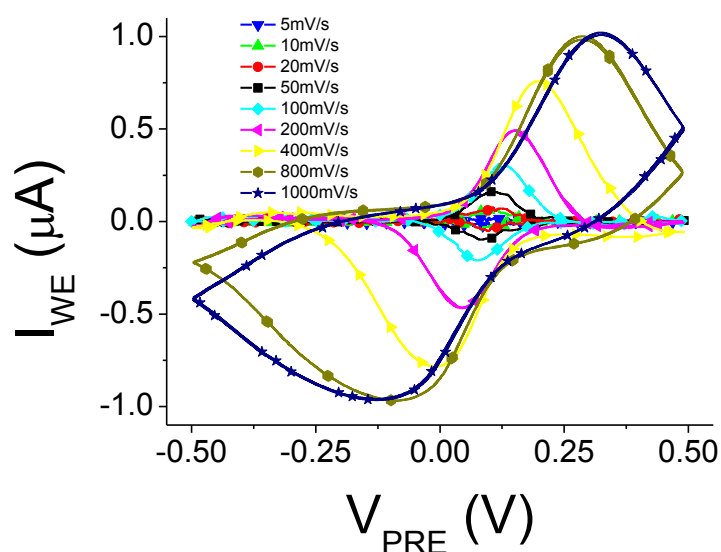
Pred samotným meraním kriviek cyklickej „lock-in“ voltametrie (CLV) s použitím „lock-in“ systému, bolo potrebné optimalizovať jeho parametre. V systéme existujú dve sady pulzov, prvý prenáša pulzy na elektrochemické bunky a druhý referenčný je použitý k demultiplexovaniu signálu. Ideálny časový posun medzi nimi bol experimentálne overený a posúdený podľa zisku najlepšieho výťažku signálu na hodnotu $28\mu\text{s}$. Zároveň bolo testované nastavenie frekvencií 4 generátorov. Frekvencie, ani ich vyššie harmonické, by sa nemali rovnať, pretože by dochádzalo k vzniku nežiadúceho rušenia. Vhodnými sa javilo nastavenie frekvencií na 970, 1001, 1030 a 1060 Hz. [75]

Pre testovanie boli vyrobené dva elektrochemické systémy. Bolo zistené, že pre druhý systém je vhodnejšie použiť frekvencie generátorov nastavené na 881, 997, 1017 a 1030 Hz.

7.6 Testovanie elektrochemického čipu metódou CLV

CLV testovanie prebehlo za použitia $\approx 2,5\text{mM}$ roztoku $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ pri rôznych skenovacích rýchlostiach. Na pseudoreferenčné elektródy bol vkladán symetrický signál v tvare píly s minimálnou a maximálnou hodnotou nastavenou na -500 mV a $+500\text{ mV}$.

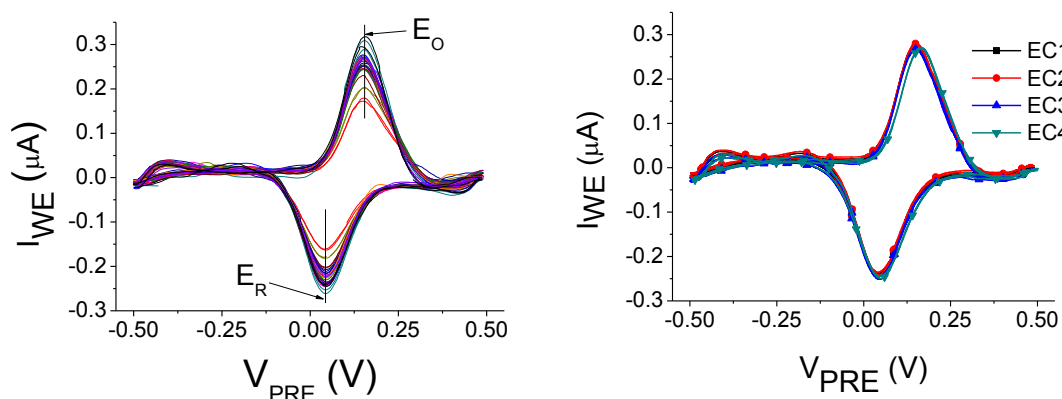
Na Obr. 7-8 je zobrazený výsledok CLV testovania jedného kanála. Správanie systému je podobné ako v predchádzajúcom prípade na Obr. 7-6 s odstránením superponovanej sigmoidálnej krivky až do rýchlosti skenovania nastavenej na hodnotu $400\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pri rýchlosti skenovania nastavenej na hodnotu $1000\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ dochádza k dominancii nabíjacieho prúdu a skenovanie systému s vyššou rýchlosťou skenovania nie je potrebné.



Obr. 7-8 Krivky z CLV testované v $\approx 2,5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku pri rýchlostiach skenovania $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ až $1000 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

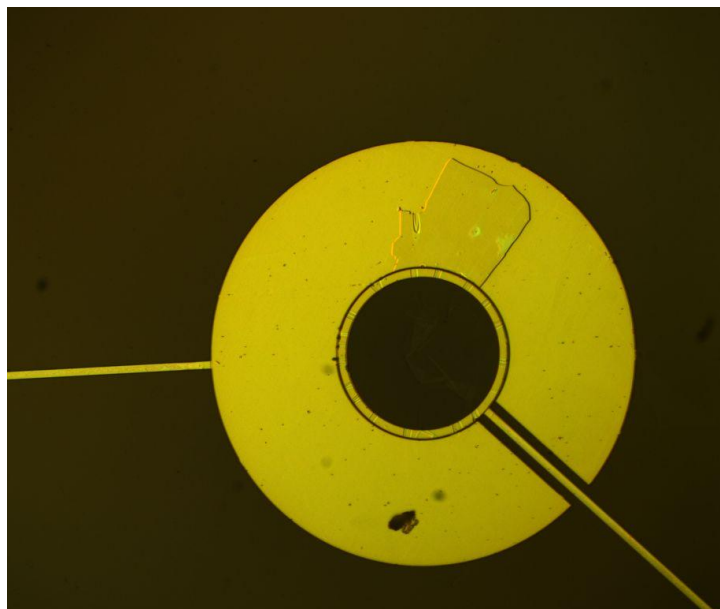
Ďalšími meraniami bola sledovaná reprodukovateľnosť systému (Obr. 7-9). Pri sledovaní odozvy všetkých 16 kanálov bola odhalená nepracujúca elektrochemická bunka. Nakoľko je každý klaster tvorený 4 elektrochemickými bunkami, bolo jednoduché takúto odlišnosť detekovať. Oxidačný I_{WE} (I_{WE0}) a jeho potenciál (E_O) mali hodnoty v poradí (priemer a štandardná odchýlka) $(0.256 \pm 0.033) \mu\text{A}$ a $(0.151 \pm 0.002) \text{ V}$. Redukčný I_{WE} (I_{WER}) a jeho potenciál (E_R) $(-0.223 \pm 0.025) \mu\text{A}$ a $(0.044 \pm 0.003) \text{ V}$.

CLV 4 elektrochemických buniek z jedného klastra malo hodnoty v poradí (priemer \pm štandardná odchýlka) I_{WE0} $(0.253 \pm 0.006) \mu\text{A}$ a E_O $(0.155 \pm 0.006) \text{ V}$ a I_{WER} a jeho E_R $(-0.241 \pm 0.011) \mu\text{A}$ a $(0.0471 \pm 0.003) \text{ V}$.



Obr. 7-9 Krivky z CLV testované v $\approx 2,5 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku: vľavo CLV 15 klasterov, vpravo CLV klasteru č. 6 pri rýchlostiach skenovania nastavených na $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Pri testovaní elektrochemických čipov sa zistilo, že na niektorých kusoch je nedoleptaná vrstva SiO_2 , ktorá znemožňuje ich testovanie. Vrstva oxidu s predpokladanou hrúbkou 10 – 20 nm vytvárala pri sledovaní mikroskopom vizuálny dojem popraskaného skla. Čipy boli doleptané suchým leptaním CHF_3 „reactive ion etching“ (RIE).

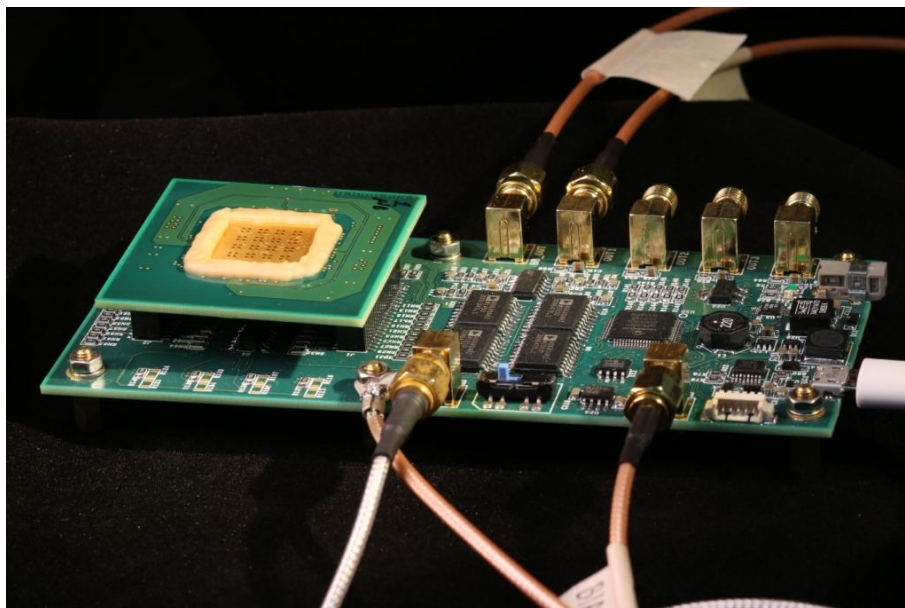


Obr. 7-10 Detail čipu s nedoleptanou vrstvou SiO_2

7.7 II. generácia „lock-in” elektrochemického systému

Nový „lock-in” systém (Obr. 7-11) má oproti predchádzajúcemu systému niekoľko výhod. V novom systéme je možné nastavenie širšieho spektra frekvencií. Systém obsahuje vstavaný generátor napätia a umožňuje nastavenie parametrov priebehu CV a stripovacej voltametrie. Ďalšími výhodami sú možnosti pripojenia k osobnému počítaču pomocou USB konektoru, ktorý ovláda systém cez jednu aplikáciu a tiež konektivita vstupov a výstupov systému realizovaná cez SMA káble.

Spočiatku mal systém nedostatky, ktoré bolo možné opraviť na diaľku preprogramovaním pomocou programátora PICKit3 a integrovaného programovacieho prostredia MPLAB IPE (Microchip).



Obr. 7-11 II. generácia „lock-in“ elektrochemického systému

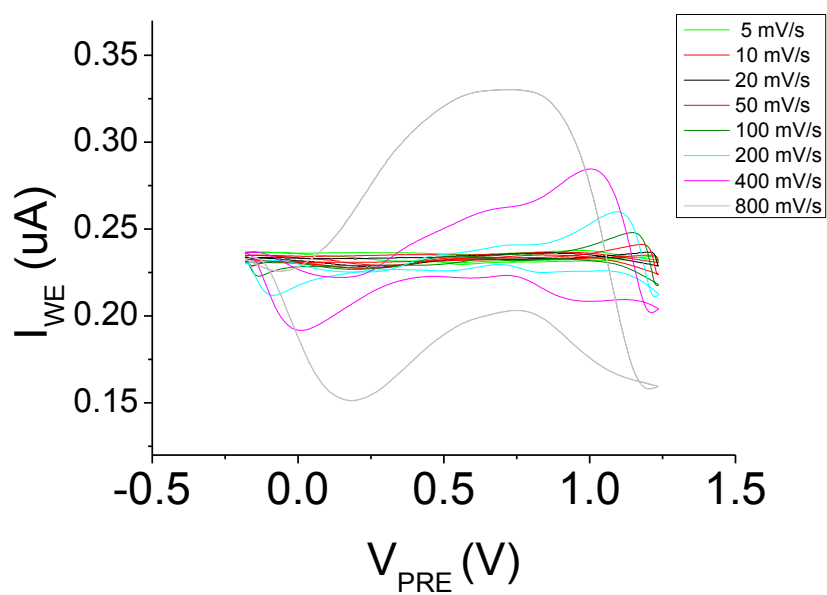
7.8 Detekcia cysteínu

Za účelom detekovať pomocou elektrochemického systému reálnu vzorku, boli pomocou nového „lock-in“ systému zmerané CV (Obr. 7-12 Obr. 7-13) a DPV (Obr. 7-14 a Obr. 7-15) s modelovou látkou cysteín.

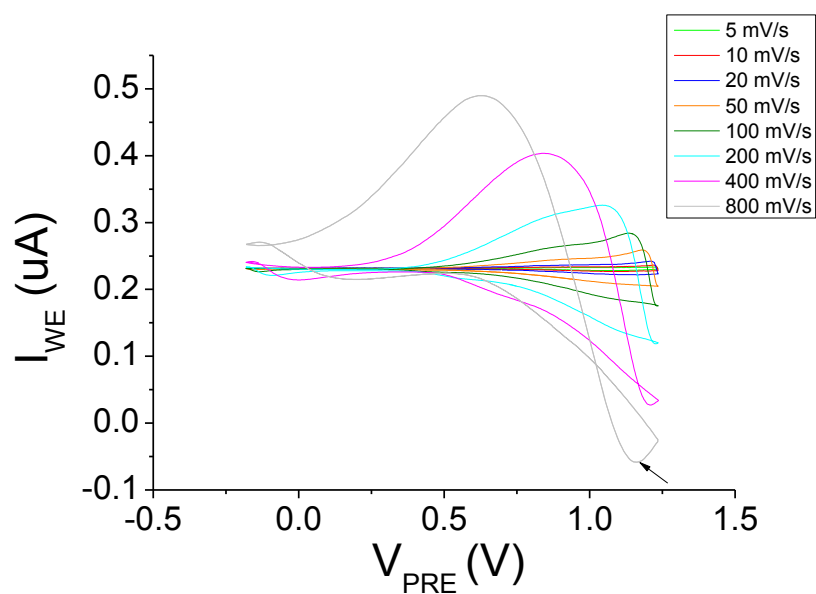
Roztok bol pripravený zmiešaním $\approx 0,04\text{M}$ cysteínu s Britton-Robinson pufrom (hodnota $\text{pH} \approx 3$) v pomere 1:10 a 1:20. Na pseudoreferenčné elektródy bol vkladán symetrický signál v tvare píly s minimálnou a maximálnou hodnotou napätia nastavenou na -200 mV a $+1300\text{ mV}$ pre CV. Nakoľko nový systém umožňuje nezávislé zapínanie a vypínanie generátorov, frekvencia jedného z generátorov bola nastavená na hodnotu 2000 Hz , čo zodpovedá perióde $500\text{ }\mu\text{s}$. Dĺžka pulzov bola nastavená na polovicu periódy, vďaka čomu systém fungoval v režime merania DPV.

V práci sú uvedené spracovania CV kriviek pre pufer (Obr. 7-12) a roztok cysteínu s pufrom (Obr. 7-13), následne DPV kriviek pre pufer (Obr. 7-14) a roztok cysteínu s pufrom (Obr. 7-15). Výsledné krivky by mali byť správne prevrátené podľa osi y, nakoľko signál prechádzal v systéme operátorom v invertujúcom móde.

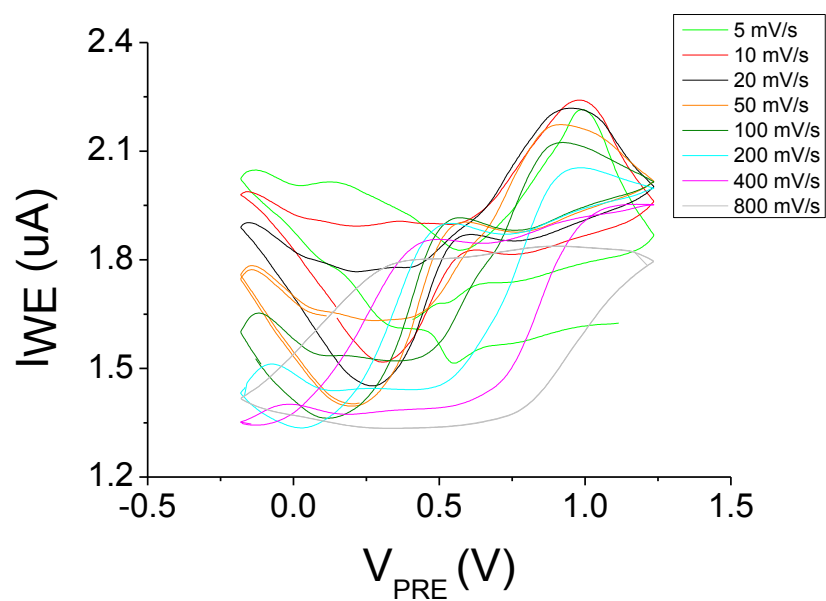
Pri porovnaní kriviek pufov a pufov s cysteínom, je možné pozorovať oxidačný pík cysteínu pri hodnote napätia okolo $1,3\text{ V}$. Meranie kriviek s cysteínom zmiešaným v pomere 1:20 nezobrazovalo oxidačný ani redukčný pík. Dôvodom slabšej elektrochemickej odozvy v celom meraní bolo pravdepodobne použitie starého roztoku cysteínu.



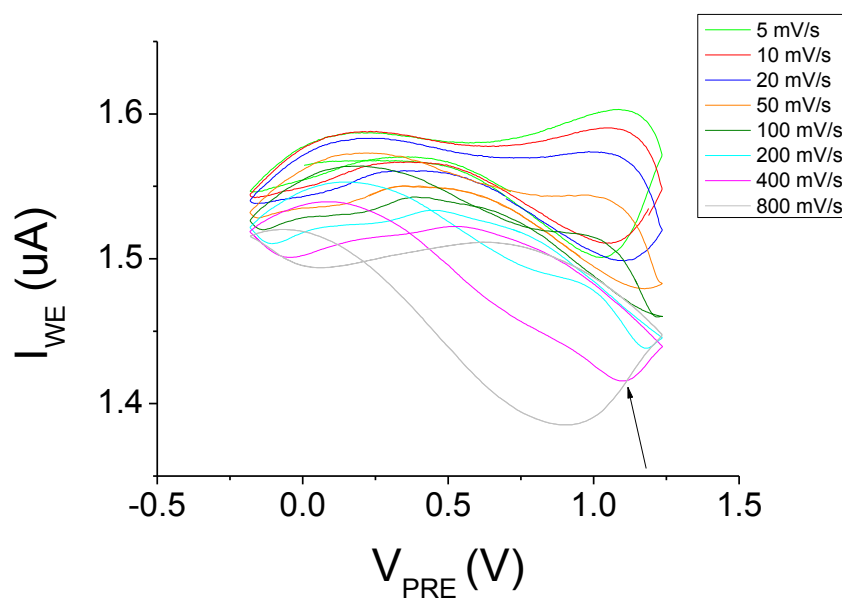
Obr. 7-12 CV krivky pufru Britton-Robinson



Obr. 7-13 CV krivky $\approx 0,04M$ cysteínu v pufri Britton-Robinson v pomere 1:10, šípka označuje najlepšie viditeľný oxidačný pík



Obr. 7-14 DPV krivky pufru Britton-Robinson



Obr. 7-15 DPV krivky $\approx 0,04M$ cysteínu v pufri Britton-Robinson v pomere 1:10, šípka označuje najlepšie viditeľný oxidačný pík

7.9 Diskusia

V kapitole sú prezentované informácie o inovatívnom elektrochemickom systéme. Vďaka použitiu „lock-in“ zosilovača mohol systém súčasne detekovať signál zo 4 elektrochemických buniek. K meraniu bol navyše použitý elektrochemický čip pozostávajúci až zo 64 elektrochemických buniek.

Testovaním systému bez „lock-in“ zosilovača, s použitím štandardného roztoku $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ s koncentráciou $\approx 2,5 \text{ mM}$ bolo zistené, že elektródy vykazujú mikroelektrodové správanie. Dôkazom bola aj niekoľkonásobne väčšia vypočítaná hodnota aktívnej plochy pracovnej elektródy, na základe Randles-Ševčíkovej rovnice, v porovnaní s reálnou geometrickou hodnotou. Jav bol pravdepodobne spôsobený $2 \mu\text{m}$ medzerou medzi pracovnou a pseudoreferenčnou elektródou.

Po optimalizácii parametrov elektrochemického systému, t.j. nastavení parametrov, pri ktorých bol získaný najlepší výťažok signálu, bol tento testovaný metódou CLV. Bolo zistené, že systém má dobrú reprodukovateľnosť. Odozva 4 elektrochemických buniek z jedného zhluku, v podobe CLV kriviek, je takmer identická. Pri porovnaní odozvy 16 elektrochemických buniek je viditeľná mierna odlišnosť odozvy jedného z klastrov od priemeru. Dôvodom odlišnosti by mohol byť rozdiel v dĺžke cesty medzi elektródami a padmi medzi elektródami. Nedoleptanie vrstvy SiO_2 je v tomto prípade málo pravdepodobné, pretože elektródy v jednom klastri mali rovnaký priebeh kriviek.

S výrobou nového „lock-in“ systému má experimentátor viac voľnosti pri voľbe nastavení systému. Vyrobený systém mal zo začiatku závady, z ktorých väčšina bola po komunikácii s výrobcom odstránená. K využitiu všetkých funkcií, ktoré by systém mal obsahovať, je ale potrebných niekoľko ďalších úprav nasledovaných podrobnými testami systému pre optimalizáciu parametrov systému.

Na novom systéme bola detekovaná reálna vzorka cysteínu metódou CV a DPV. Detekovanie biomarkerov po zväžení časovej náročnosti merania nebolo uskutočnené.

ZÁVER

Cieľom práce bola analýza problematiky detekcie biologických analytov – rakovinových biomarkerov pomocou pulzných metód s využitím mikrofluidického čipu. Reálne práca obsahuje riešenia niektorých krokov vedúcich k takejto detekcii a rešerše v daných oblastiach.

K detekcii biomarkerov, ktorá by mala dostatočnú výpovednú hodnotu, by bolo z časového hľadiska pravdepodobne potrebné pracovať s komerčnými elektródami a systémom na meranie umožňujúcim meranie CV a následne aj DPV a to pri použití bežných objemov vzoriek. Druhou možnosťou by bolo použitie komerčne dostupných mikročipov a systémov na meranie.

Diplomová práca mala charakter reálneho výskumu, ktorého výsledkom bude publikácia, ktorá je momentálne v stave upravovania pripomienok od recenzentov. Preto sa zadanie vyvíjalo v závislosti od potrieb, ktoré sa objavili počas riešenia zadania. Na vývoji systému a metodiky merania pracovala skupina študentov a doktorantov. Nakoľko sa jedná o medziodborovú tému, niektoré kroky boli konzultované s ďalšími odborníkmi pre konkrétnu problematiku.

V práci bol popísaný význam biomarkerov pri rakovinovom ochorení s detailnejším popisom prostatického špecifického antigénu – PSA. Ten je považovaný za najvhodnejší biomarker k detekcii rakoviny v skorom štádiu, konkrétne karcinómu prostaty. Biomarker sa v praxi používa pri screeningu cieľenej skupiny pacientov.

Teoretická časť diplomovej práce obsahuje aj kapitoly so základnými informáciami potrebnými k zorientovaniu sa v problematike ohľadom používanej elektrochemickej metódy k detekcii analytov – voltametria a o mikrofluidických systémoch.

Práca navrhuje niekoľko riešení mikrofluidických systémov, ktoré môžu byť použité v spojení s elektrochemickým systémom k detekcii niekoľkých biomarkerov.

Na začiatku bola praktická časť práce sústredená najmä na vytvorenie mikrofluidického čipu, ktorý by ako platforma pre elektrochemický čip usmerňoval prúd kvapaliny podľa potreby experimentu. Prvotne bol systém vytvorený z materiálu typického na výrobu prototypov mikrofluidických systémov – z PDMS. Na výmennom pobyte študentov v rámci diplomovej práce bol tento materiál zmenený podľa dostupnosti CNC obrábacích nástrojov na materiál PMMA. Rovnako boli zmenené techniky k výrobe čipov súvisiace s výberom materiálu; najprv používaná metóda „soft“ litografie pre PDMS, neskôr mikroobrábanie PMMA plátu CNC nástrojom.

Po tom, ako boli externe vyrobené a narezané elektrochemické čipy, prebiehalo ich

základné testovanie, na ktorom sa v rôznej miere podieľal celý tím. Z dôvodu potreby poznať správanie nových elektrochemických buniek, t.j. pracovnej a pseudoreferenčnej elektródy i celého elektrochemického systému s „lock-in“ zosilovačom, postupovalo sa pri meraní vždy od najzákladnejších metód. Čipy tak boli najprv opticky kontrolované, následne testované so štandardným roztokom $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ s rôznymi pripravenými koncentráciami, najprv základnou voltametrickou metódou CV, potom DPV. K meraniu bol spočiatku použitý komerčne dostupný systém $\mu\text{Autolab III}$ Potentiostat/galvanostat (Metrohm AG), neskôr elektrochemický systém s konvertorom prúdu pracovnej elektródy I_{WE} na napätie V_{OUT} . Až po týchto meraniach sa začalo pracovať s „lock-in“ zosilovačom elektrochemického systému.

V práci bol prezentovaný prenosný elektrochemický systém pre detekciu biologických vzoriek. Jedinečnosť systému spočíva v použití „lock-in“ amplifikácie, vďaka ktorej je možné merať signál zo 4 elektrochemických buniek súčasne.

Inovatívnym prvkom bol tiež samotný elektrochemický čip s veľkosťou iba $\approx 18 \times \approx 18$ mm a obsahom 64 elektrochemických buniek rozdelených do 16 klastrov. Dvojelektrodový systém má medzi pracovnou a pseudoreferenčnou elektródou prstencových tvarov $2\mu\text{m}$ medzeru spôsobujúcu mikroelektrodové správanie pracovnej elektródy. Toto chovanie potvrdil aj 6,3 násobok rozmeru aktívnej plochy vypočítanej na základe meraní oproti reálnej ploche.

K testovaniu systému bol použitý štandardný roztok $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Systém vykazoval dobrú reprodukovateľnosť. Elektrochemické bunky jedného klastru mali takmer úplne totožné výsledky detekcie. V prípade výskytu nefungujúcej elektrochemickej bunky by tak došlo k jej rýchlemu odhaleniu.

Testovaný bol tiež nový „lock-in“ systém. Po meraní $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ nasledovala detekcia reálnej vzorky cysteínu. V meraní by bolo vhodné pokračovať a pripraviť viac koncentrácií roztokov s čerstvým cysteínom.

Ďalším krokom vývoja elektrochemického systému bude kombinácia s mikrofluidickou platformou a funkcionizovanie systému vhodnými molekulami k detekcii proteínových biomarkerov alebo biomarkerov s povahou nukleových kyselín. Tiež bude potrebné pokračovať s meraniami na novom „lock-in“ systéme, ktorý poskytuje viac možností v nastaveniach systému. K využitiu všetkých funkcií, ktorými by systém mohol operovať, je potrebné vykonať niekoľko úprav od výrobcu, optimalizácií a testov.

LITERATÚRA

- [1] World Health Organization [online]. 2017 [cit. 2017-04-06]. Cancer: Fact sheet. Dostupné z: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>
- [2] FRANK, R. a R. HARGREAVES Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2003, roč. 2, č. 7, s. 566-580. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/nrd1130. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1038/nrd1130>>
- [3] Z., ADAM, KREJČÍ M. a VORLÍČEK J. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. 394 s. ISBN 978-80-7262-715-8.
- [4] MITRA, S. K. a S. CHAKRABORTY *Microfluidics and Nanofluidics Handbook: Fabrication, Implementation, and Applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012. 641 s. ISBN 978-143-9816-738.
- [5] LUO, X. L. a J. J. DAVIS Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, roč. 42, č. 13, s. 5944-5962. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1039/c3cs60077g. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1039/c3cs60077g>>
- [6] PHEENEY, C. G., A. R. ARNOLD, M. A. GRODICK, et al. Multiplexed Electrochemistry of DNA-Bound Metalloproteins. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, roč. 135, č. 32, s. 11869-11878. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1021/ja4041779. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <<https://dx.doi.org/10.1021%2Fja4041779>>
- [7] DOLL, R. a R. PETO THE CAUSES OF CANCER - QUANTITATIVE ESTIMATES OF AVOIDABLE RISKS OF CANCER IN THE UNITED-STATES TODAY. *Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1981, roč. 66, č. 6, s. 1191-1308. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 0027-8874. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017215#>>
- [8] COFFEY, J. C., J. H. WANG, M. J. F. SMITH, et al. Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. *Lancet Oncology* [online]. 2003, roč. 4, č. 12, s. 760-768. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/s1470-2045(03)01282-8. ISSN 1470-2045. Dostupné z: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01282-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01282-8)>
- [9] ATKINSON, A. J., W. A. COLBURN, V. G. DEGRUTTOLA, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2001, roč. 69, č. 3, s. 89-95. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1067/mcp.2000.113989. ISSN 0009-9236. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>>
- [10] CHATTERJEE, S. K. a B. R. ZETTER Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future oncology (London, England)* [online]. 2005, roč. 1, č. 1, s. 37-50. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1517/14796694.1.1.37. ISSN 1479-6694. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1517/14796694.1.1.37>>

- [11] BENSALAH, K., F. MONTORSI a S. F. SHARIAT Challenges of cancer biomarker profiling. *European Urology* [online]. 2007, roč. 52, č. 6, s. 1601-1609. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/j.eururo.2007.09.036. ISSN 0302-2838. Dostupné z: <[dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2007.09.036](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.09.036)>
- [12] ANDRE, F. a L. PUSZTAI Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nature Clinical Practice Oncology* [online]. 2006, roč. 3, č. 11, s. 621-632. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/ncponc0636. ISSN 1743-4254. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1038/ncponc0636>>
- [13] DALTON, W. S. a S. H. FRIEND Cancer biomarkers - An invitation to the table. *Science* [online]. 2006, roč. 312, č. 5777, s. 1165-1168. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1126/science.1125948. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1126/science.1125948>>
- [14] COLLINS, F. S. a H. VARMUS A New Initiative on Precision Medicine. *New England Journal of Medicine* [online]. 2015, roč. 372, č. 9, s. 793-795. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1056/NEJMp1500523. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1056/NEJMp1500523>>
- [15] Š., SVOBODOVÁ, PEŠTA M., TOPOLČAN O., et al. *Biomarkery v onkologii*. Brno: Tribun EU, 2012. 40 s. ISBN 978-80-263-0324-4.
- [16] PRITZKER, K. P. H. Cancer biomarkers: Easier said than done. *Clinical Chemistry* [online]. 2002, roč. 48, č. 8, s. 1147-1150. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 0009-9147. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142366>>
- [17] *Masarykův onkologický ústav: Oddělení laboratorní techniky* [online]. 2017 [cit. 2017-04-07]. Využití nádorových markerů v klinické praxi - doporučení odborných společností. Dostupné z: <<https://www.mou.cz/olm-vyuziti-nadorovych-markeruv-klinicke-praxi-doporuceni-odbornych-spolecnosti/f813>>
- [18] PALEČEK, E., J. TKÁČ, M. BARTOŠÍK, et al. Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics. *Chemical Reviews* [online]. 2015, roč. 115, č. 5, s. 2045-2108. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1021/cr500279h. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1021/cr500279h>>
- [19] PEZARO, C., H. H. WOO a I. D. DAVIS Prostate cancer: measuring PSA. *Internal Medicine Journal* [online]. 2014, roč. 44, č. 5, s. 433-440. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1111/imj.12407. ISSN 1444-0903. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1111/imj.12407>>
- [20] ARMBRUSTER, D. A. PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN - BIOCHEMISTRY, ANALYTICAL METHODS, AND CLINICAL-APPLICATION. *Clinical Chemistry* [online]. 1993, roč. 39, č. 2, s. 181-195. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 0009-9147. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679336>>
- [21] ANGELIS, G., H. G. RITTENHOUSE, S. D. MIKOLAJCZYK, et al. Twenty Years of PSA: From Prostate Antigen to Tumor Marker. *Rev Urol* [online]. 2007, roč. 9, č. 3, s. 113-123. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 1523-6161 Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934568>>

- [22] TORMEY, W. P. The complexity of PSA interpretation in clinical practice. *Surgeon-Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* [online]. 2014, roč. 12, č. 6, s. 323-327. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/j.surge.2014.04.003. ISSN 1479-666X. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1016/j.surge.2014.04.003>>
- [23] *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2001. 316 s. ISBN 80-86380-07-6.
- [24] WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 3 vyd. New Jersey: Wiley-VCH, 2006. 250 s. ISBN 978-0-471-67879-3.
- [25] Nobel Media AB [online]. 2017 [cit. 2017-04-07]. Jaroslav Heyrovsky - Facts. Dostupné z: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1959/heyrovsky-facts.html>
- [26] KIZEK R. [online]. 2011 [cit. 2017-04-07]. Bioelektrochemie a nanotechnologie: Instrukční a studijní materiály. Dostupné z: <<http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/03.php?deta=28>>
- [27] HEYROVSKÝ, J. a P. ZUMAN *Practical Polarography: An Introduction for Chemistry Students*. New York: Academic Press Inc., 1968. 237 s. ISBN 978-1-4832-2746-7.
- [28] F., OPEKAR, JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ P., et al. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [29] ZUTSHI, K. *Introduction to Polarography and Allied Techniques*. 2. prepracované vyd. New Delhi: New Age International, 2006. 284 s. ISBN 978-81-224-1791-3.
- [30] F., SCHOLZ *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. 2 vyd. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. 359 s. ISBN 978-3-642-02914-1.
- [31] SEILER, H., A. SIGEL a H. SIGEL *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York: M. Dekker, 1994. 940 s. ISBN 0-8247-9094-4.
- [32] COMPTON, R.G. a C.E. BANKS *Understanding Voltammetry*. 2 vyd. London: Imperial College Press, 2011. 429 s. ISBN 978-184-8165-854.
- [33] KISSINGER, PETER T. a WILLIAM R. HEINEMAN Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* [online]. 1983, roč. 60, č. 9, s. 702. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1021/ed060p702. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1021/ed060p702>>
- [34] *Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra fyzikální chemie* [online]. [cit. 2017-10-04]. Cyklická voltametrie. Skripta fyzikální chemie. Dostupné z: <fch.upol.cz/skripta/pok1/Cyklicka_voltametrie.pdf>
- [35] *Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra fyziky povrchů a plazmatu* [online]. [cit. 2017-04-10]. Cyklická voltametrie. Dostupné z: <<http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/cv>>

- [36] BARD, A. J. a L. R. FAULKNER *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2. vyd. New York: John Wiley & Sons, 2001. ISBN 978-0471043720.
- [37] THOMAS, F. G. a G. HENZE *Introduction to Voltammetric Analysis: Theory and Practice*. Collingwood: CSIRO Publishing, 2001. 264 s. ISBN 978-06-431-0264-4.
- [38] SMEJKAL, P. a F. FORET Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci. *Chemicke Listy* [online]. 2012, roč. 106, č. s. 104-112. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 1213-7103. Dostupné z: <www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_104-112.pdf>
- [39] SQUIRES, T. M. a S. R. QUAKE Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics* [online]. 2005, roč. 77, č. 3, s. 977-1026. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1103/RevModPhys.77.977. ISSN 0034-6861. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>>
- [40] WHITESIDES, GEORGE M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* [online]. 2006, roč. 442, č. 7101, s. 368-373. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/nature05058. ISSN 00280836. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1038/nature05058>>
- [41] DITTRICH, P. S. a A. MANZ Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2006, roč. 5, č. 3, s. 210-218. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/nrd1985. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd1985>>
- [42] HRAZDIRA, I. a V. MORNSTEIN *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. 381 s. ISBN 80-902-8961-4.
- [43] FOLCH, A. *Introduction to BioMEMS*. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2016. 528 s. ISBN 978-1-43981-839-8.
- [44] COOKSEY, G. A., C. G. SIP a A. FOLCH A multi-purpose microfluidic perfusion system with combinatorial choice of inputs, mixtures, gradient patterns, and flow rates. *Lab on a Chip* [online]. 2009, roč. 9, č. 3, s. 417-426. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1039/b806803h. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1039/b806803h>>
- [45] TENG, J., J. CHU, CH. LIU, et al. Fluid Dynamics in Microchannels. Fluid Dynamics, Computational Modeling and Applications. [online]. 2012, roč. č. s. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.5772/28336. ISSN 978-953-51-0052-2. Dostupné z: <<http://www.intechopen.com/books/fluid-dynamics-computational-modeling-and-applications/fluid-dynamics-in-microchannels>>
- [46] RANDS, C., B. W. WEBB a D. MAYNES Characterization of transition to turbulence in microchannels. *International Journal of Heat and Mass Transfer* [online]. 2006, roč. 49, č. 17-18, s. 2924-2930. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2006.02.032. ISSN 0017-9310. Dostupné z: <<http://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2006.02.032>>
- [47] LABEED, F.H. a H.O. FATOYINBO *Microfluidics in Detection Science: Lab-on-a-chip Technologies*. Royal Society of Chemistry, 2014. 281 s. ISBN 978-1-84973-638-1.

- [48] ALRIFAIY, A., O. A. LINDAHL a K. RAMSER Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering. *Polymers* [online]. 2012, roč. 4, č. 3, s. 1349-1398. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.3390/polym4031349. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.3390/polym4031349>>
- [49] LI, D. *Electrokinetics in Microfluidics*. 2 vyd. Oxford: Academic Press, 2004. 652 s. ISBN 978-00-805-3074-1.
- [50] STONE, H. A., A. D. STROOCK a A. AJDARI Engineering flows in small devices: Microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annual Review of Fluid Mechanics* [online]. 2004, roč. 36, č. s. 381-411. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124. ISSN 0066-4189. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124>>
- [51] TESAŘ, V. Mikrofluidika. *AUTOMA* [online]. 2008, roč. 8, č. 10, s. 6 - 9. [cit. 2017-05-17]. DOI ISSN 1210-9592. Dostupné z: <<http://www.odbornecasopisy.cz/res/pdf/37953.pdf>>
- [52] SHAIKH, K. A., K. S. RYU, E. D. GOLUCH, et al. A modular microfluidic architecture for integrated biochemical analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2005, roč. 102, č. 28, s. 9745-9750. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1073/pnas.0504082102. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <<https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.0504082102>>
- [53] LASER, D. J. a J. G. SANTIAGO A review of micropumps. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2004, roč. 14, č. 6, s. R35-R64. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1088/0960-1317/14/6/r01. ISSN 0960-1317. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/14/6/R01>>
- [54] NGUYEN, N. T. a Z. G. WU Micromixers - a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2005, roč. 15, č. 2, s. 3263-3287. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1088/0960-1317/15/2/r01. ISSN 0960-1317. Dostupné z: <<https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms12053263>>
- [55] BEEBE, D. J., G. A. MENSING a G. M. WALKER Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2002, roč. 4, č. s. 261-286. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916. ISSN 1523-9829. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>>
- [56] BECKER, H. a L. E. LOCASCIO Polymer microfluidic devices. *Talanta* [online]. 2002, roč. 56, č. 2, s. 267-287. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/S0039-9140(01)00594-X. ISSN 0039-9140. Dostupné z: <[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00594-X)>
- [57] ABGRALL, P. a A. M. GUÉ Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2007, roč. 17, č. 5, s. 15-49. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1088/0960-1317/17/5/R01. ISSN 0960-1317. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/5/R01>>

- [58] BECKER, H. a C. GARTNER Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, roč. 390, č. 1, s. 89-111. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1007/s00216-007-1692-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1692-2>>
- [59] TSAO, CHIA-WEN a DON L. DEVOE Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2009, roč. 6, č. 1, s. 1-16. [cit. DOI 10.1007/s10404-008-0361-x. ISSN 1613-4990. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10404-008-0361-x>>
- [60] BECKER, H. a C. GARTNER Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* [online]. 2000, roč. 21, č. 1, s. 12-26. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1002/(sici)1522-2683(20000101)21:1<12::aid-elps12>3.3.co;2-z. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1%3C12::AID-ELPS12%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1%3C12::AID-ELPS12%3E3.0.CO;2-7)>
- [61] SACKMANN, E. K., A. L. FULTON a D. J. BEEBE The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* [online]. 2014, roč. 507, č. 7491, s. 181-189. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/nature13118. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1038/nature13118>>
- [62] NEUZIL, P., C. D. M. CAMPOS, C. C. WONG, et al. From chip-in-a-lab to lab-on-a-chip: towards a single handheld electronic system for multiple application-specific lab-on-a-chip (ASLOC). *Lab on a Chip* [online]. 2014, roč. 14, č. 13, s. 2168-2176. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1039/C4LC00310A. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4LC00310A>>
- [63] MCDONALD, J. C., D. C. DUFFY, J. R. ANDERSON, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* [online]. 2000, roč. 21, č. 1, s. 27-40. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1002/(sici)1522-2683(20000101)21:1<27::aid-elps27>3.3.co;2-3. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1%3C27::AID-ELPS27%3E3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1%3C27::AID-ELPS27%3E3.0.CO;2-C)>
- [64] KUNCOVA-KALLIO, J. a P. J. KALLIO PDMS and its Suitability for Analytical Microfluidic Devices. *International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* [online]. 2006, roč. č. s. 2486-2489. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1109/iembs.2006.260465. ISSN 1557-170X Dostupné z: <<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.260465>>
- [65] HORIBE, H., M. YAMAMOTO, S. TAKAMATSU, et al. Resolution and sensitivity of a resist with and without hexamethyldisilazane determined using profilometry. *Journal of Photopolymer Science and Technology* [online]. 2006, roč. 19, č. 1, s. 75-80. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.2494/photopolymer.19.75. ISSN 0914-9244. Dostupné z: <<http://doi.org/10.2494/photopolymer.19.75>>
- [66] SIA, S. K. a G. M. WHITESIDES Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* [online]. 2003, roč. 24, č. 21, s. 3563-3576. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1002/elps.200305584. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1002/elps.200305584>>
- [67] WILLIAMS, K. R., K. GUPTA a M. WASILIK Etch rates for micromachining processing - Part II. *Journal of Microelectromechanical Systems* [online]. 2003, roč. 12,

č. 6, s. 761-778. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1109/jmems.2003.820936. ISSN 1057-7157. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1109/JMEMS.2003.820936>>

[68] KIN FONG, L. *Chapter 1 Materials and Fabrication Techniques for Nano- and Microfluidic Devices*. The Royal Society of Chemistry, 2015. 1-28 s. ISBN 978-1-84973-638-1.

[69] SATO, K., M. SHIKIDA, T. YAMASHIRO, et al. Anisotropic etching rates of single-crystal silicon for TMAH water solution as a function of crystallographic orientation. *Sensors and Actuators a-Physical* [online]. 1999, roč. 73, č. 1-2, s. 131-137. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1016/S0924-4247(98)00271-4. ISSN 0924-4247. Dostupné z: <[https://doi.org/10.1016/S0924-4247\(98\)00271-4](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(98)00271-4)>

[70] REGEHR, K. J., M. DOMENECH, J. T. KOEPESEL, et al. Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture. *Lab on a Chip* [online]. 2009, roč. 9, č. 15, s. 2132-2139. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1039/b903043c. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1039/b903043c>>

[71] YAO, X., Z. CHEN a G. CHEN Fabrication of PMMA microfluidic chips using disposable agar hydrogel templates. *Electrophoresis* [online]. 2009, roč. 30, č. 24, s. 4225-4229. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1002/elps.200900502. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1002/elps.200900502>>

[72] MARTINEZ, A. W., S. T. PHILLIPS a G. M. WHITESIDES Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2008, roč. 105, č. 50, s. 19606-19611. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1073/pnas.0810903105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0810903105>>

[73] SU, W. J., B. S. COOK, Y. N. FANG, et al. Fully inkjet-printed microfluidics: a solution to low-cost rapid three-dimensional microfluidics fabrication with numerous electrical and sensing applications. *Scientific Reports* [online]. 2016, roč. 6, č. s. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.1038/srep35111. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <<https://dx.doi.org/10.1038/srep35111>>

[74] BALRAM, K. C. , D. A. WESTLY, M. DAVANCO, et al. The Nanolithography Toolbox. *J. Res. Natl. Inst. Stand.* [online]. 2016, roč. 121, č. s. 464-475. [cit. 2017-05-17]. DOI 10.6028/jres.121.024. ISSN Dostupné z: <<https://dx.doi.org/10.6028/jres.121.024>>

[75] NOVÁK, LUKÁŠ. Metoda citlivé optoelektronické detekce a její aplikace. Czech Technical University in Prague, 2013.